

SÉRIE A, N° 4243

N° D'ORDRE : 5094

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Guy RIOU

1^{re} THÈSE. — « Les désoxyribonucléases neutres du
sérum sanguin chez les mammifères
supérieurs. Aspects biochimiques et
génétiques ».

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 4 mars 1964 devant la Commission d'examen.

M^{lle} LE BRETON

Président

MM. CHEVALLIER

TRUHAUT

} *Examineurs*

LIBRAIRIE MALOINE S.A.

27 Rue de l'École-de-Médecine PARIS VI^e

—
1964

FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

Nom du Candidat : RIOU

Prénom : Guy

Date de la soutenance : 4 Mars 1964

Numéro d'ordre : Série A, 4243, N° 5094

1

RIOU Guy. — Les désoxyribonucléases neutres du sérum sanguin chez les mammifères supérieurs. Aspects biochimiques et génétiques. — *Paris*, librairie Maloine, 1964, 86 p., 25 fig.

Th. Sc. Phys. Paris, 1964, Série A, 4243, N° 5094.

2

RIOU Guy. — Les désoxyribonucléases neutres du sérum sanguin chez les mammifères supérieurs. Aspects biochimiques et génétiques. — *Paris*, librairie Maloine, 1964, 86 p., 25 fig.

Th. Sc. Phys. Paris, 1964, Série A, 4243, N° 5094.

3

RIOU Guy. — Les désoxyribonucléases neutres du sérum sanguin chez les mammifères supérieurs. Aspects biochimiques et génétiques. — *Paris*, librairie Maloine, 1964, 86 p., 25 fig.

Th. Sc. Phys. Paris, 1964, Série A, 4243, N° 5094.

4

RIOU Guy. — Les désoxyribonucléases neutres du sérum sanguin chez les mammifères supérieurs. Aspects biochimiques et génétiques. — *Paris*, librairie Maloine, 1964, 86 p., 25 fig.

Th. Sc. Phys. Paris, 1964, Série A, 4243, N° 5094.

SÉRIE A, N° 4243

N° D'ORDRE : 5094

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Guy RIOU

1^{re} THÈSE. — « Les désoxyribonucléases neutres du
sérum sanguin chez les mammifères
supérieurs. Aspects biochimiques et
génétiques ».

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 4 mars 1964 devant la Commission d'examen.

M^{lle} LE BRETON

Président

MM. CHEVALLIER

TRUHAUT

} *Examineurs*

LIBRAIRIE MALOINE S.A.

27 Rue de l'École-de-Médecine PARIS VI^e

—
1964



FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen M. ZAMANSKY

C. JULIA T Analyse supérieure et algèbre supérieure.
 PRENANT T Anatomie et Histologie comparée.
 GRASSÉ T Evolution des êtres organisés.
 PREVOST T Chimie organique.
 WYART T Minéralo. et Cristal.
 TEISSIER T Zoologie.
 MANGENOT T Biol. Végét. (Orsay).
 AUGER T Physique quantique et relativité.
 MONNIER T Physiologie générale.
 PIVETEAU T Paléontologie.
 ROCARD T Physique (ENS).
 CARTAN T Mathématiques (ENS).
 LAFFITTE T Chimie générale.
 FAVARD T Géométrie supérieure.
 COULOMB T Physique du globe.
 M^{lle} COUSIN T Biol. animale (SPCN).
 CHRETIEN T Chimie minérale.
 DRACH T Zoologie.
 KASTLER T Physique ENS.
 EPHRUSSI T Génétique.
 RIVIÈRE T Géol. SPCN et Sédimentologie (Orsay).
 GAUTHERET T Biologie Vég. (PCB).
 LUCAS R. T Recherches Physiques.
 THOMAS A. T Biologie cellulaire.
 ARNULF T Optique appliquée.
 MORAND T Physique Enseignement.
 SOLEILLET T Physique (PCB).
 FORTIER T Mécanique Exp. des Fluides.
 PETIT T Biologie maritime.
 QUENEY T Météor. et dynamique atmosphérique.
 GALLIEN T Embryologie.
 EICHORN T Botanique.
 DE CUGNAC T Biologie Vég. (SPCN).
 M^{lle} CAUCHOIS T Chimie Physique.
 THELLIER T Physique du globe.
 L'HERITIER T Biol. générale (Orsay).
 GRIVET T Radioélectricité (Orsay).
 PONCIN T Mécanique générale.
 DUBREIL T Arithm. et Théorie des Nombres.
 QUELET T Chimie organique.
 CAGNIARD T Géophysique appliquée.
 CHAMPETIER T Chimie macromolécul.
 CUVILLIER T Micropaléontologie.
 JUNG T Géologie.
 TRILLAT T Microscopie et diffraction électro.
 WIEMANN T Chimie organ. et struct.
 JACQUINOT T Spectroscopie et Phys. céleste (Orsay).
 VASSY T Physique de l'Atmosph.
 DESTOUCHES T Théorie Physiques.
 AMIEL T Chimie générale.
 HOCART T Minéralo et Cristallog.
 J. P. MATHIEU T Physique Optique.
 COUTEAUX T Cytologie.
 MAY T Zoologie (Orsay).
 CHOQUET T Théorie des fonctions et Topologie.
 FELDMANN T Biologie végét. marine.
 GUINIER T Physique des Solides (Orsay).
 JOST T Physiologie comparée.
 FORTET T Calcul des Probabilités et Phys. mathémat.
 SCHWARTZ T Calcul diff. et Intégral.
 CHOUARD T Physiologie végétale.
 MALAVARD T Aviation (Tech. Aéron.).
 BRELOT T Calcul diff. et Intégr.
 NORMANT T Synthèse organique.
 EENARD T Chimie minérale.
 BUVAT T Botanique (ENS).
 DUGUE T Statistiques Mathém.
 SOULAIRAC T Psychophysologie.
 ULRICH T Physiol. Vég. Appliq.

MARECHAL T Optique théor. et Appli.
 KIRRMANN T Théories chimiques.
 CHADEFAUD T Botanique.
 M^{lle} LE BRETON T Physiol. de la Nutrit.
 LELONG T Application de l'analyse à la géométrie.
 DEVILLERS T Anatomie et Hist. Compar.
 EHRESMANN T Topologie Algébrique.
 FRANCON T Physique (SPCN).
 GLANGEAUD T Géographie Phys. et Géol.
 GODEMENT T Mathématiques (MGP).
 PISOT T Tech. Math. de la Phys.
 ROCH T Géologie.
 SCHATZMANN T Astrophysique.
 TERMIER T Géologie générale.
 ZAMANSKY T Mathématiques générales.
 LENUYER T Physique (MGP).
 RIZET T Génétique (Orsay).
 ROUTHIER T Géologie appliquée.
 M^{me} TONNELAT T Physique théorique.
 DIXMIER T Mathématiques (MPC).
 SOUGHAY T Chimie générale.
 AIGRAIN T Electrotechnique gén.
 BRUSSET T Chimie systématique.
 M. LEVY T Physique théorique des hautes énergies (Orsay).
 M^{me} CHAIX T Chimie biologique.
 M^{me} HUERT-PY T Biologie végét. (PCB).
 PIAUX T Chimie (MPC).
 BRUN T Mécanique théorique des fluides.
 LEDERER T Chimie biolog. (Orsay).
 M^{me} DUBREIL T Mathématiques (Agrég.).
 M^{me} LELONG T Mathématiques II (ENS).
 BELLAIR T Géologie (SPCN).
 COTTE T Physique électricité.
 DUBOIS J. E. T Chimie organique.
 LAMOTTE T Zoologie (ENS).
 MICHEL A. T Chimie minérale (Orsay).
 OLMER T Energétique générale.
 ROUAULT T Electricité (Orsay).
 GAUTHIER T Mécanique appliquée.
 BARCHEWITZ T Chimie Physique.
 BROSSEL T Physique atomique.
 BUSER T Physiologie comparée.
 CAMUS T Physiologie Vég. Orsay.
 CASTAING T Physique II Thermo (Orsay).
 CURIEN T Minéralo. et cristallog.
 MOYSE T Physiol. Végét. (Orsay).
 NOIROT T Evolution des Etres Org.
 PANNETIER T Chimie générale.
 POSSOMPES T Zoologie.
 PULLMANN T Chimie quantique.
 TEILLAC T Physique Nucl. et Radioactivité (Orsay).
 TONNELAT T Biol. Physico-chim (Ors.).
 VILLE T Econométrie.
 WILLEMART T Chimie PCB.
 DODE T Chimie (Orsay).
 FREYMAN T Recherches Physiques.
 GUINOCHET T Biol. Vég. SPCN (Orsay).
 ROLLET T Chimie minérale.
 M^{lle} JOSIEN T Chimie SPCN.
 CHEVALLEY T Géométrie algéb. et théorie des groupes.
 ARNOULT T Electronique (Orsay).
 CHAPPELLE T Physique I (Orsay).
 DELANGE T Mathématiques I (Orsay).
 DENY T Mathématique Gén. (Orsay).
 GERMAIN T Mécanique théor. des fluides.
 LUCAS G. T Géologie.
 ALLARD T Chimie Physique.
 BERTHELOT T Phys. des particules Fondamentales (Orsay).
 BRICARD T Météor. et Physique de l'Atmosphère.
 M^{me} ALBE-FESSARD T Psycho-physiol.
 FRIEDEL T Physique des solides (Orsay).

M. JULIA	T Etudes des Moléculaires complexes.	CHEVAUGEON	T Botanique (Orsay).
LENDER	T Biol. Animale SPCN (Orsay).	KAHANE	T Mathématiques (Orsay).
MAGAT	T Physico-Chimie des radioéléments.	SAMUEL	T Mathématiques ENS féminines.
M ^{lle} QUINTIN	T Electrochimie.	KOURGANOFF	T Astronomie (Orsay).
MONOD	T Chimie du métabolisme.	THIRY	T Mécanique céleste.
BENOIT	T Physiol. animale (Orsay).	ABELES	T Physique SPCN.
DE POSSEL	T Analyse numérique.	AMAT	T Physique PCB.
CHARLOT	T Chimie analytique.	AUBOIN	T Géologie.
LEMEE	T Ecologie Vég. (Orsay).	M ^{me} BENOIT-GUEUTAL	T Phys. Nucléaire et radioactivité (Orsay).
GUERIN	T Chimie MPC (Orsay).	BOUGIS	T Biologie marine (Villefranche/Mer).
CHATELET M.	T Chimie PCB.	BRUHAT	T Mathématiques MPC.
JEAN	T Physique Nucl. (Orsay).	BRUNN	T Géologie historique (Orsay).
MATTLER	T Physique SPCN.	CHABBAL	T Physique MGP (Orsay).
BERGERARD	T Zoologie (Orsay).	DEHEUVELS	T Mathématique Propé.
BERTEIN	T Electronique (Orsay).	D'ESPAGNAT	T Physique théorique (Orsay)
BOUSSIÈRES	T Radiochimie.	FURON	T Géologie SPCN.
M ^{me} COUTURE	T Thermo. et Méca. Physique.	M ^{me} GANS	T Génétique.
ELLENBERGER	T Géologie des grandes régions du globe.	GENEVES	T Biologie végétale PCB.
FRANC	T Biologie animale PCB.	GUILBERT	T Physique (CUS Orléans).
SCHNELL	T Botanique tropicale.	HUPE	T Pétrographie.
STOLKOWSKI	T Physiologie végétale.	HOLLANDE	T Biologie générale.
ACHER	T Chimie Biologique.	LIONS	T Analyse numérique.
BAUDOIN	T Biologie animale PCB.	MAITE	T Chimie PCB.
BEAUMONT	T Biologie animale SPCN.	MEYER	T Physique propédeutique.
BLAMONT	T Géophysique-ionosphère.	NICOLAS	T Géologie appliquée.
BOURREAU	T Botanique.	PANIGEL	T Biologie générale.
CURIE D.	T Physique MGP.	RAVIER	T Pétrographie.
DURAND-DELGA ..	T Géologie.	ROSEAU	T Méca. théor. des fluides.
FREON	T Chimie organique (Orsay).	ROUBINE	T Electronique.
HELLER	T Physiol. végétale.	SILBER	T Chimie PCB.
TORTRAT	T Calcul des Probabilités.	UEBERSFELD	T Electronique.
CAILLEUX	T Géologie (SPCN).	YVON	T Théories Physiques.
MAGNAN	T Physique SPCN.	HERVE	T Mathématiques.
DAUDEL	T Mécanique ondulatoire appli. à la chimie Théor. et à la Phys. Nucléaire.	NERON	T Mathémat. MPC (Orsay).
M ^{lle} FOURCROY	T Biologie végét. SPCN.	M ^{me} PECKER-WIMEL	T Astrophysique.
M ^{me} CHOQUET-BRUHAT	T Mécan. Analytique et Méca. céleste.	BALKANSKY	T Physique MPC.
M ^{lle} VEIL	T Physiologie générale.	LE CORRE	T Electricité.
LWOFF	T Microbiologie.	DELROIX	T Physique théorique (Orsay).
SIESTRUNCK	T Mécan. Phys. et Expérim.	GOURDIN	T Phys. Théor. des Hautes-Energies (Orsay).
LACOMBE	T Métallurgie des métaux Nucléaires (Orsay).	LEHMANN	T Phys. Exp. des Hautes Energies (Orsay).
BROCHARD	T Physique PCB (Orsay).	NATAF	T Physique nucléaire et radioactivité (Orsay).
CABANNES	T Mécanique générale.	ECHALIER	T Biologie animale PCB.
LESIEUR	T Mathématiques I (Orsay).	BARRAUD	T Physiologie cellulaire.
MAZET	T Méca. générale (Orsay)	LIORET	T Physiologie végét. Orsay.
CAIRE	T Géographie phys. et Géol. Dynamique.	DARS	T Géologie struc. et Géol. appliquée.
COMOLET	T Mécanique des Fluides.	CAMEFORT	T Botanique (agrégation).
CORABUEUF	T Physiol. animale (Orsay).	VICHNIEWSKY	T Mécanique industrielle.
DELLOUE	T Physique de l'exosphère.	BLAQUIÈRE	T Electronique (Orsay).
GORENFLOT	T Botanique II (Orsay).	ARNOUS	T Physique théorique.
HOUILLOIN	T Biologie animale PCB.	TATIBOUET	T Chimie (CSU Orléans).
JULLIEN J.	T Chimie SPCN (Orsay).	MALLIAVIN	T Mathématique propé. Orsay.
MALGRANGE	T Technique Math. de la Physique (Orsay).	GAUDEMAR	T Chimie Propé.
OLIVIER	T Anthropologie.	PEREZ Y JORBA	T Phys. Exp. des Hautes énergies (Orsay).
NOZERAN	T Botanique II (Orsay).	DAVID	T Chimie (Agrég. Orsay).
BLANC-LAPIERRE ..	T Phys. ENS (Orsay).	BROUSSE	T Mécanique théorique.

Le secrétaire Général..... R. POUILLAIN.

Mlle LE BRETON, Professeur à la Faculté des Sciences, m'a permis, grâce à ses conseils, de mener à bien ce travail. Je la prie d'agréer l'expression de ma profonde reconnaissance et mes sentiments de très respectueux dévouement.

M. TRUHAUT, Professeur à la Faculté de Pharmacie, m'a fait le grand honneur de m'accueillir parmi ses élèves. Je le prie de bien vouloir accepter l'expression de ma vive gratitude et l'assurance de mon respectueux et affectueux attachement.

M. CHEVALLIER, Maître de Conférences à la Faculté des Sciences, a bien voulu accepter de faire partie de mon Jury. Je lui exprime mes sentiments très reconnaissants.

M. DENOIX, Professeur Agrégé à la Faculté de Médecine, m'a fait le grand honneur de me recevoir à l'Institut Gustave-Roussy qu'il dirige avec bienveillance et autorité. Je le prie d'accepter avec mon profond respect mes sentiments fidèlement reconnaissants.

J'exprime toute mon amicale reconnaissance à M. PAOLETTI, Professeur Agrégé à la Faculté de Pharmacie, qui animé de son inlassable dynamisme, n'a cessé de m'encourager.

Que tous mes collègues des Unités de Chimiothérapie et de Biochimie qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail, trouvent ici l'expression de mon amicale gratitude.

Je remercie particulièrement Mlles COLIN, MONGE et ROME et MM. GOSSE, JACQUEMIN-SABLON et PASCAUD.

Je tiens à remercier également Mme AUBIN, Mlle de LANGAVANT et M. MENAGER qui m'ont facilité l'accomplissement de ce travail.

INTRODUCTION

Des travaux récents ont permis de faire progresser d'une manière spectaculaire la compréhension des mécanismes qui régissent les fonctions essentielles des organismes vivants. La mise en évidence du rôle des acides nucléiques et, plus particulièrement des acides désoxyribonucléiques (ADN) dans la transmission des caractères héréditaires constitue un fait très important qui a orienté toute une série de travaux. Dans ce domaine extrêmement complexe, WATSON et CRICK (88) en élucidant la structure chimique de l'ADN ont présenté un modèle moléculaire qui permettait d'expliquer les mécanismes de la duplication, de la transmission, et de la mutation des gènes. Les hypothèses de WATSON et CRICK ont été confirmées par de nombreux travaux qui ont montré notamment que les informations contenues dans la molécule d'ADN sont déterminées par les séquences précises des paires de bases, transmises et fidèlement copiées d'une génération à l'autre.

Ces dernières années ont été également fructueuses dans le domaine de la compréhension du mécanisme d'action de certains virus pathogènes puisqu'il a été prouvé que, d'une part l'acide ribonucléique (ARN) et d'autre part l'acide désoxyribonucléique (ADN), qui entrent dans la constitution de certains virus, pouvaient reproduire les particules virales infectieuses. Nous citerons les trois cas actuellement connus de virus oncogènes dont les ADN sont infectieux : le virus du papillome de Shope, le virus du polyome et le virus SV 40.

Dans ces conditions on conçoit aisément l'importance prise par l'étude actuelle des enzymes qui dans le cadre d'une infection par des virus à ADN provoquent sa dépolymérisation et donc son inactivation biologique.

Notre travail entre dans un cadre de recherches ayant pour but de préciser les moyens de défense que peut posséder un organisme de mammifères supérieurs vis-à-vis d'un ADN infectieux et oncogène. Outre l'éventuelle mise en jeu d'interféron, ces moyens de défense semblent se répartir en deux grands groupes :

- d'une part la barrière immunologique, constituée par les anticorps que peut synthétiser cet organisme ;
- d'autre part la barrière biochimique due à l'existence, dans tous

les organes et dans le sang, d'enzymes nucléasiques et notamment de désoxyribonucléases (DNases) capables de dégrader très rapidement l'ADN.

C'est pourquoi dans ce mémoire nous nous sommes proposé d'étudier les caractéristiques de la DNase neutre (DNase I) contenue dans le sérum ou le plasma de plusieurs mammifères supérieurs.

Il faut cependant souligner deux points :

1) La démonstration *in vitro* de l'activité particulière d'un enzyme ne signifie pas nécessairement que celle-ci corresponde à sa fonction métabolique normale ou que le substrat expérimental soit celui sur lequel elle s'exerce dans des conditions physiologiques normales.

2) Des enzymes, appartenant à différentes espèces animales, qui possèdent la même spécificité vis-à-vis d'un même substrat et, qui catalysent la même réaction peuvent néanmoins posséder des propriétés physico-chimiques différentes. L'hétérogénéité des enzymes est relativement fréquente, on a montré que dans certains organismes appartenant à des espèces différentes il existait plus de trente enzymes se présentant sous de nombreuses formes moléculaires (28).

Plusieurs critères permettent d'individualiser ces enzymes : la mobilité électrophorétique, l'élution chromatographique, la spécificité d'action vis-à-vis de certains effecteurs (activateurs ou inhibiteurs) de réactions enzymatiques, etc.

Nous avons dans ces conditions fragmenté notre étude en cinq parties.

La première partie comporte un rappel bibliographique des travaux concernant les désoxyribonucléases I et leurs inhibiteurs.

Dans la seconde partie nous présentons les méthodes expérimentales mises en œuvre dans ce mémoire.

Dans la troisième partie nous avons étudié les valeurs de l'activité DNasique dans le sérum ou le plasma de quelques mammifères supérieurs : homme, chat, rat, lapin, souris.

La quatrième partie rend compte des résultats des études biochimiques et enzymatiques comparatives faites sur la DNase I des sérums de chat, de rat et de souris.

Enfin dans la cinquième partie nous avons étudié le conditionnement génétique de la DNase I des plasmas de souris de souches C₃H et XLII.

PREMIERE PARTIE

RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE CONCERNANT LES DESOXYRIBONUCLEASES I ET LEURS INHIBITEURS

I. — Généralités sur les désoxyribonucléases I de mammifères supérieurs

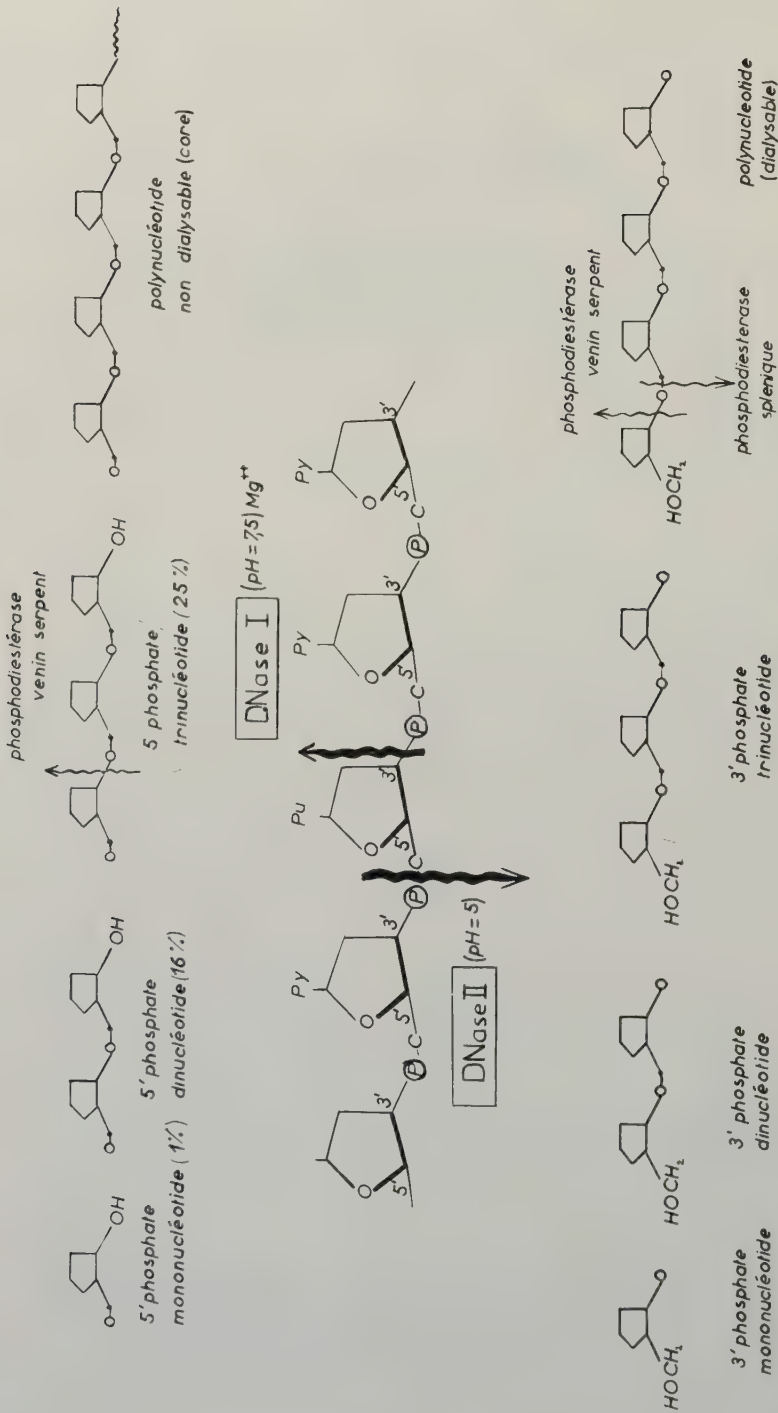
De nombreux extraits tissulaires et des sécrétions telles que le suc pancréatique ont la propriété de liquéfier les gels d'ADN sans libération de phosphate minéral ou de bases puriques et pyrimidiques, mais avec

ORIGINE et NOMS	p H OPTIMUM	ACTIVATEUR	SPECIFICITE D'ACTION	AUTEURS
Pancréas de bœuf DNase I	7,0	Mg ⁺⁺	(d) p Pu $\downarrow$ p Py → Esters 5'P	KUNITZ (1950) (40)
Thymus de veau DNase II	4,5		(d) Py p $\downarrow$ Pu p → Esters 3'P	MAVER et GRECO (1949) (58)
Rate de veau DNase II	4,5		id. preced.†	MAC DONALD (1955) (19)
Prostate humaine	5,2		Type DNase II	BOWAN (1958) (10)
Rein de veau	7,0 4,5	Mg ⁺⁺	Type DNase I Type DNase II	CUNNINGHAM et LASKOWSKI (1953) (16)
Sérum humain	7,5	Mg ⁺⁺	Type DNase I	WROBLEWSKI et BODANSKY (1949) (89)
Cellules de l' Adénocarcinome d'Ehrlich	8,5 5,0	Mg ⁺⁺	Type DNase I Type DNase II	STANSLY P.O. (1960) (84)

TABLEAU I

Principales Désoxyribonucléases de mammifères supérieurs

la libération d'oligonucléotides (49). Ces observations anciennes s'expliquent par la présence dans les préparations, de DNases, enzymes capables d'hydrolyser les ADN par rupture de liaisons phosphodiester responsables de leur architecture polynucléotidique. Ces DNases appar-



MODE D'ACTION DES DESOXYRIBONUCLEASES

FIG. I

tiennent pour cette raison au sous-groupe des phosphodiesterases. De nombreuses DNases ont été décrites ; elles sont répandues aussi bien chez les mammifères supérieurs que chez les microorganismes et les plantes.

Chez les mammifères, ainsi que le montre le tableau I, les DNases existent dans tous les tissus. Quelques-unes ont été étudiées en détail. Ce sont toutes des endonucléases. Elles catalysent la coupure des liaisons internucléotidiques à l'intérieur des chaînes de polynucléotides. On peut les classer en deux groupes ; d'une part les DNases I qui hydrolysent les liaisons phosphodiester des chaînes polynucléotidiques en libérant les fonctions 5' phosphate et d'autre part les DNases II qui libèrent les fonctions 3' phosphate.

La spécificité d'action portant sur les liaisons phosphodiester n'est pas le seul critère de différenciation de ces DNases. Le pH optimal d'action ainsi que la concentration optimale d'ions activateurs varient suivant les 2 types de DNase. Nous avons schématisé sur la figure 1 le mode d'action des DNases I et II.

Nous rappellerons les principales propriétés de la DNase I qui seront utilisées au cours de ce travail.

LA DNASE I DE KUNITZ.

Cette DNase, extraite du pancréas de bœuf, a été cristallisée pour la première fois par KUNITZ (40).

Son poids moléculaire varie suivant les méthodes et les auteurs, 60 000 pour KUNITZ (41) et pour SMITH (80), 40 000 pour POLSON (70). Son point isoélectrique est voisin de 5, son pH optimum d'activité se situe aux environs de 7 en présence d'ions Mg^{++} qui jouent le rôle d'activateurs.

Nous allons rappeler les principales expériences qui ont permis de mettre en évidence la spécificité et le mode d'action de la DNase I.

1) *Spécificité.*

La DNase I attaque préférentiellement les liaisons (d) pPu-pPy à l'exception de la liaison (d) pG-pC, avec libération des fonctions monoester 5' phosphate.

Ces faits ont été démontrés :

— par SINSHEIMER (78) (79) en étudiant les produits d'hydrolyse de la réaction ADN-DNase,

- par TAMM et coll. (85) et TAKEMURA (86) en étudiant la cinétique d'action de la DNase sur les acides apuriniques et apyrimidiques,
- par RALPH et coll. (72) en étudiant la cinétique d'action de la DNase sur les polynucléotides de synthèse dont les séquences en bases peuvent être dans certaines conditions contrôlées.

Il convient d'ajouter que la réaction s'arrête lorsque 25 % des liaisons ont été hydrolysées (42) (56).

2) *Mode d'action.*

Les nombreuses études physico-chimiques faites ont abouti aux conclusions que nous allons résumer brièvement.

Il faut se rappeler que la molécule d'ADN est constituée de deux chaînes polynucléotidiques reliées entre elles par des liaisons hydrogène. Seules les liaisons phosphodiester de la chaîne nucléotidique sont directement attaquées par l'enzyme. Pour qu'il y ait coupure de la molécule, il faudra qu'il apparaisse deux liaisons hydrolysées sur les deux chaînes adjacentes.

Les travaux qui ont été entrepris à ce sujet laissent supposer que l'attaque de la molécule d'ADN par l'enzyme peut se dérouler ainsi. Tout d'abord, on observe une période de latence pendant laquelle aucune modification physico-chimique importante ne peut être décelée. Pendant cette période, le nombre des liaisons phosphodiester hydrolysées n'est pas suffisant pour qu'il y ait coupure de la molécule. Il est toutefois très important de constater, si l'on reprend les travaux de ZAMENHOF et coll. (90) sur l'ADN doué de pouvoir transformant, que c'est au cours de cette période que l'activité biologique de la molécule disparaît.

Au cours de l'étape suivante la viscosité des solutions, le poids moléculaire, la biréfringence d'écoulement, la constante de sédimentation baissent alors rapidement. Pendant cette période la molécule est scindée en fragments sans qu'il y ait dénaturation. La structure secondaire est conservée et le nombre des liaisons hydrogène rompues est négligeable. La troisième étape est caractérisée par la dénaturation des produits d'hydrolyse. Par suite de la rupture des liaisons hydrogène, on observe un effet hyperchromique se traduisant par une augmentation de l'absorption de la lumière ultra-violette par la solution. C'est également pendant cette période que l'affinité de l'ADN pour certains colorants (vert de méthyle) diminue.

La dernière étape de la réaction est caractérisée par l'apparition d'éléments si petits qu'ils sont dialysables et qu'ils ne sont plus précipitables par les acides forts. La réaction s'arrête lorsque 25 % des liaisons ont été hydrolysées.

II. — Généralités sur les inhibiteurs de désoxyribonucléases I

Les inhibiteurs de DNases peuvent être répartis en trois groupes : substances minérales, substances organiques, substances biologiques mal définies. Ce dernier groupe est certainement le plus intéressant car il rassemble des inhibiteurs plus ou moins spécifiques préexistant au sein des tissus vivants. Nous nous proposons de présenter succinctement les travaux qui se rapportent aux inhibiteurs de DNase rencontrés chez les mammifères supérieurs.

1) *Inhibiteurs minéraux.*

La DNase I pancréatique requiert pour manifester son activité un certain nombre de cations bivalents dont le plus couramment utilisé est l'ion Mg^{++} à la concentration optimale de 20 à 25 micromoles/ml. Le rôle inhibiteur joué par les fluorures, arsénates, borates et sélénites s'expliquerait par complexation des ions Mg^{++} . La DNase II est par contre inhibée par de telles concentrations de Mg^{++} , l'inhibition est totale pour 50 micromoles/ml. Les anions polyvalents tels que les sulfates sont de puissants inhibiteurs de DNase II à pH égal ou supérieur à 5.

2) *Inhibiteurs organiques.*

Citrate, oxalate et EDTA sont des inhibiteurs de DNases de type I car ils complexent les ions divalents activateurs (Mg^{++} , Ca^{++}). La DNase I est sensible à l'action de divers polymères synthétiques acides. Le rôle de l'héparine *in vitro* reste très mal défini ; pour ROTH (75), HEYMAN et coll. (31) l'héparine serait inhibitrice, mais l'effet est peu net. Selon HENSTELL et coll. (29), KURNICK (42), les doses couramment utilisées pour empêcher la coagulation sanguine sont sans effet aussi bien sur la DNase de KUNITZ que sur les DNases sanguines de diverses espèces animales. HERRIOTT (30) a vérifié qu'elle est inhibitrice de la DNase sérique humaine à la concentration de 40 $\mu g/ml$ bien qu'inactive sur la DNase pancréatique. On peut citer parmi les inhibiteurs de DNases neutres des composés dont l'action s'explique surtout par interaction avec l'ADN. Il s'agit des composés du groupe des acridines (45).

3) *Inhibiteurs biologiques.*

C'est au cours de la purification de la DNase I que MACCARTY (12) et LASKOWSKI (48) ont supposé l'existence dans le pancréas, d'inhibiteurs de cet enzyme. ALFREY et MIRSKY (1) ont montré que l'activité DNasique des extraits pancréatiques de diverses espèces animales

variait en fonction du pH et de la température auxquels ils étaient préalablement soumis. Ces faits peuvent s'expliquer par la destruction d'un inhibiteur. CUNNINGHAM et LASKOWSKI (16) ont mis en évidence, dans le rein de veau, une activité DNasique de type I et II. Ils ont remarqué que l'activité DNasique I augmente lorsque les homogénats sont conservés à pH 3, ce qui laisse supposer la présence d'un inhibiteur de DNase de type I. A la suite des travaux de DABROWSKA et coll. (17) qui ont montré l'action inhibitrice d'extrait de glande du jabot de pigeon sur la DNase I, COOPER et coll. (15) ont entrepris une étude portant sur divers organes de mammifères. Ces auteurs ont mis en évidence un inhibiteur dans le foie et les testicules de veau. La plupart des organes du rat normal se révèlent également inhibiteurs de la DNase de KUNITZ, tout particulièrement le foie, les testicules, et à un degré moindre les poumons, la rate, et le cœur. Le muscle et le rein sont par contre dénués d'activité. Cependant il semble que le mode de préparation des homogénats joue un rôle important, l'extraction de l'inhibiteur se faisant d'autant mieux que le broyage est plus grossier. Une étude rudimentaire du fractionnement cellulaire montre en outre que l'inhibiteur n'est pas présent dans les noyaux, mais dans la fraction cytoplasmique soluble de la cellule hépatique. Bien que les auteurs ne le précisent pas, on peut supposer que ces inhibiteurs sont de nature protéinique. Très récemment LINDBERG (54) a partiellement purifié un inhibiteur extrait de la rate de veau qui possède les propriétés générales d'une protéine. Cet inhibiteur est thermolabile, stable aux environs de pH 7,6, présente un spectre d'absorption caractéristique des protéines entre 250 et 350 m μ , et est inactivé par l'action de faibles concentrations de trypsine. FESTY et coll. (23) viennent de décrire un inhibiteur présent dans divers organes du rat.

D'autres essais de recherches d'inhibiteurs biologiques naturels ont porté sur le sang. MONZEN (60) a remarqué que la dilution du sérum humain, du mouton, et du cheval, augmente proportionnellement l'activité DNasique. Ce phénomène résulterait de la disparition d'un inhibiteur sérique. DE RECONDO et coll. (73) expliqueraient l'augmentation de l'activité DNasique du sérum chez le rat hépatectomisé partiellement, par une modification d'un équilibre enzyme-inhibiteur. BERGER et MAY (8) ont caractérisé un inhibiteur dans le plasma de rat, sa purification est en cours. Les travaux concernant l'inhibition produite par les éléments figurés du sang sont plus nombreux. Selon HERRIOT et coll. (30) un lysat d'hématies humaines provoque une inhibition partielle de la DNase de KUNITZ. Cependant la plupart des travaux concernent les leucocytes ou leurs précurseurs médullaires. HENSTELL et coll. (29) signalent la présence d'un inhibiteur dans la moelle osseuse et le sang total humain. KURNICK et coll. (44) ont caractérisé dans les leucocytes humains normaux, un inhibiteur de la DNase neutre. Les extraits qui

sont doués d'activité DNasique. I exercent une inhibition spécifique vis-à-vis des seules DNases sériques de l'homme et du lapin. L'étude de divers cas pathologiques montre que les lymphocytes sont les plus riches et les monocytes les moins riches en inhibiteur, qui est de nature protéinique. HERRIOTT et coll. (30) enfin, ont étudié de manière très précise l'activité DNasique et RNasique de différentes fractions de sang humain. Ils ont démontré que les leucocytes contiennent un puissant inhibiteur de DNase pancréatique dont ils n'ont malheureusement pas étudié les caractéristiques.

Avant de terminer le chapitre des inhibiteurs de DNase, il faut signaler l'existence d'anticorps anti-DNase se produisant à la suite d'injections répétées soit de préparations DNasiques purifiées, soit de DNase pancréatique. JOHNSON et coll. (34) chez l'homme, MACCARTY (12) chez le lapin, ont étudié le pouvoir antigénique de la DNase pancréatique de KUNITZ.

DEUXIEME PARTIE

METHODES GENERALES UTILISEES

Nous allons exposer les principales méthodes générales qui ont été utilisées au cours de ce travail.

A. — Mesure de l'activité désoxyribonucléasique

Toutes les méthodes de dosage des DNases sont basées sur la dépolymérisation de l'ADN, d'où la nécessité d'obtenir un substrat aussi pur que possible. C'est pourquoi nous donnerons quelques précisions sur la méthode d'obtention de l'ADN. Les diverses méthodes de dosage des DNases ont été décrites dans les revues générales de LASKOWSKI (49) et de KURNICK (43).

I. — PRÉPARATION DES ACIDES DÉSOXYRIBONUCLÉIQUES.

Il existe plusieurs méthodes de préparation de l'ADN. La méthode de préparation décrite par AUBIN et coll. (2) a été appliquée. Le principe en est le suivant.

1) *Principe.*

Le principe de la plupart des méthodes de préparation de l'ADN à partir de tissus animaux consiste tout d'abord à séparer les nucléoprotéines puis à rompre l'association naturelle acide nucléique-protéine par des agents déprotéinisants. Les principales étapes de cette préparation sont :

- rupture des membranes,
- élimination des ribonucléoprotéines (RNP) et des acides ribonucléiques (ARN),
- dissociation des désoxyribonucléoprotéines (DNP) et élimination des protéines,
- purification de l'ADN par précipitation.

Nous avons utilisé la papaïne comme agent déprotéinisant. Associée à l'acide cholique, la papaïne permet d'obtenir directement à partir du thymus de veau un ADN hautement polymérisé ne contenant que de très faibles quantités de protéines (inférieures à 2 %) et d'ARN (inférieurs à 1 %).

Cette méthode présente surtout l'avantage d'être très rapide, de ne nécessiter aucune centrifugation et d'être applicable à la préparation de grandes quantités d'ADN. En effet, la papaïne attaque préférentiellement les liaisons peptidiques arginine-lysine, acides aminés particulièrement abondants dans les nucléoprotéines.

Le thymus de veau est broyé mécaniquement après lavage par une solution de NaCl 0,14 M — citrate de sodium 0,05 M. Il est mis en suspension dans cette solution et traité directement en présence d'acide cholique par la papaïne à 45 °C à pH 6,8-6,9. Ce traitement permet la dégradation des structures cellulaires et une hydrolyse de la majeure partie des protéines, notamment des histones et protamines liées à l'ADN. On purifie ensuite le milieu par filtration sur célite qui retient une grande partie des protéines et leurs produits de dégradation. On précipite ensuite l'ADN, à partir du filtrat, par l'éthanol.

2) *Conservation de l'ADN.*

Au cours de ce travail l'ADN a toujours été utilisé en solution dans NaCl 0,14 M, à une concentration de 2 mg à 3 mg/ml environ. Ces solutions sont conservées à la chambre froide en présence de chloroforme, dans des flacons de 250 ml hermétiquement bouchés.

Les solutions doivent être effectuées aseptiquement pour éviter la dépolymérisation de l'ADN par les diverses DNases secrétées par de nombreuses bactéries.

Nous avons toujours préparé ces solutions dès la précipitation des fibres d'ADN.

3) *Caractéristiques analytiques.*

On apprécie la qualité de l'ADN :

a) d'une part par les dosages chimiques :

- de ses principaux constituants (azote, phosphore, désoxyribose),
- de ses différentes impuretés (protéines et ARN).

b) d'autre part par des dosages physiques :

- analyse spectrophotométrique à des longueurs d'onde comprises entre 230 et 290 mμ,
détermination du coefficient d'extinction molaire,
mesure de l'effet hyperchromique.

Nous indiquons dans le tableau II les valeurs des caractéristiques physico-chimiques de l'ADN utilisé au cours de ce travail, comparativement aux valeurs habituellement trouvées dans la littérature (64).

DETERMINATIONS EFFECTUEES	METHODES UTILISEES	VALEURS HABITUELLEMENT OBSERVEES	VALEURS du LOT PhR ₁
Azote	Kjeldahl	14 à 16 %	15 %
Phosphore	Dryer (20)	8,5 à 9 %	9 %
Rapport N/P		1,7	1,66
Protéines	Lewry (57)	0,3 à 2 %	1,7 %
A R N	Moulié (63)	0 à 2 %	0,05 %
Spectre 260/230		2,30 [±] 0,20	2,2
Spectre 260/240		1,77 [±] 0,10	1,5
Spectre 260/280		1,77 [±] 0,06	1,8
$\epsilon_{(P)}^{260\text{ m}\mu}$		6.600 [±] 200	6.500
Hyperchromicité HCl		34 à 42 %	42 %

TABLEAU II

Caractéristiques analytiques de l'ADN de thymus de veau utilisé comparativement aux valeurs habituellement trouvées (64)

II. — DOSAGE DE LA DÉSOXYRIBONUCLÉASE I.

Le dosage de la DNase est effectué selon trois techniques.

1) Technique au vert de méthyle de KURNICK (9) (44).

Le principe en est le suivant : le vert de méthyle se fixe sur les molécules d'ADN, mais l'affinité du colorant pour l'acide nucléique diminue lorsque sa structure est altérée par dépolymérisation. De plus à pH 7,5 le vert de méthyle est incolore alors que le complexe ADN vert de méthyle, qui est stable, garde entièrement son pouvoir chromogène. Il est donc facile de suivre la dégradation enzymatique de l'ADN à ce pH, puisque, au fur et à mesure que cette dégradation progresse, le vert de méthyle libéré se décolore.

La technique consiste à faire agir, dans des conditions convenables le sérum contenant la DNase neutre sur une solution tamponnée du complexe ADN-vert de méthyle (réactif de KURNICK). Ce mélange est porté au bain-marie à 37 °C. Une partie aliquote du mélange réactionnel est prélevée à intervalles de temps réguliers, la réaction enzymatique

est arrêtée par addition de citrate trisodique, inhibiteur de DNase I. On laisse la décoloration du vert de méthyle se poursuivre pendant 18 h. Ensuite, une mesure spectrophotométrique à 640 m μ permet d'évaluer la quantité du complexe ADN-vert de méthyle non dégradé et de tracer la courbe des variations de densité optique en fonction du temps. On obtient une courbe présentant une partie linéaire dont la pente est proportionnelle à l'activité enzymatique. Pour l'étude des plasmas de souris nous avons remplacé cette technique nécessitant des quantités relativement élevées de plasma par une micro-technique. Les divers constituants du mélange réactionnel sont réduits proportionnellement.

Les résultats sont exprimés en unités KURNICK (UK) ; une unité KURNICK correspond à la chute de 0,05 unité de densité optique par millilitre et par minute, et représente l'activité DNasique de 5 μ g de DNase I cristallisée. (DNase Worthington lot n° 86 6-9).

2) Micro-technique par diffusion sur gélose à l'ADN (52).

C'est une technique très rapide qui permet de détecter et de doser les DNases neutres. Cette technique qui s'inspire de la méthode classique

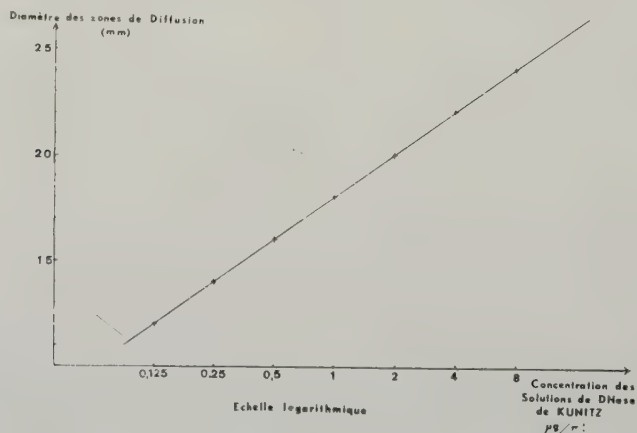


FIG. 2. — Relation entre le logarithme de la concentration en DNase de KUNITZ et le diamètre des zones de diffusion pour un volume de 30 μ l de prise d'essai (incubation de 16 h à 37 °C)

des disques utilisée pour le dosage des antibiotiques fait appel au principe de diffusion de l'enzyme à travers un gel de gélose. Le gel contient de l'ADN dont l'enzyme réalise, au cours de la diffusion, l'hydrolyse *in situ*. Les zones de diffusion sont révélées, leur diamètre est proportionnel au logarithme de la concentration en enzyme.

Du point de vue pratique on prépare une solution de gélose ayant une concentration finale d'environ 300 μg de l'ADN par millilitre. L'ADN est incorporé à la gélose à la température de 60 °C. Cette gélose est coulée sur une épaisseur de 2 mm dans des boîtes de Pétri. On applique un disque de cellulose de 8 mm de diamètre imbibé de 30 μl de la solution à doser. On laisse incuber 16 h à l'étuve à 37° et on révèle à l'aide d'une solution de vert de méthyle. Des solutions à diverses concentrations de DNase pure (DNase cristallisée Worthington) servent de gamme étalon, une solution de tampon Tris-HCl 0,1 M pH = 7,5 sert de témoin réactif.

L'activité DNasique se manifeste par la présence d'une zone de diffusion circulaire non colorée en vert entourant l'emplacement du disque de cellulose. Après avoir mesuré le diamètre de cette zone on se reporte au graphique de la figure 2 qui donne une relation entre la concentration en DNase et le diamètre de diffusion.

3) Méthode de KUNITZ dite des « acido solubles » (40).

a) Principe.

Le principe de cette méthode décrite par KUNITZ repose sur les données suivantes : lors de l'hydrolyse de l'ADN par la DNase il y a libération d'oligonucléotides solubles dans une solution alcoolique d'acide perchlorique alors que dans ces conditions le substrat précipite. La quantité d'oligonucléotides « acido solubles » est déterminée par mesure de l'absorption à 260 $\mu\mu$ ou par dosage du désoxyribose.

Cette méthode permet :

- soit d'estimer l'activité DNasique du milieu biologique considéré,
- soit d'effectuer une étude cinétique de l'action enzymatique en fonction de la concentration en substrat.

b) Détermination de l'activité DNasique.

Les réactifs utilisés sont les suivants :

- R. 1. — Solution d'ADN à 2 mg/ml dans une solution de chlorure de sodium à 0,14 M.
- R. 2. — Solution de tampon Tris HCl 0,4 M à pH 7,5.
- R. 3. — Solution de sulfate de magnésium 0,3 M.
- R. 4. — Solution de chlorure de sodium 0,14 M.
- R. 5. — Solution alcoolique d'acide perchlorique 2 N.

La DNase I pure utilisée pour tester la réaction est fournie par Worthington Biochemical Corporation lot n° 86 6-9. Cette DNase, préparée à partir du pancréas de bœuf est cristallisée une fois. Une solution mère titrant 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ est préparée par dissolution de l'enzyme dans du NaCl 0,14 M. Elle est répartie et conservée à — 20 °C dans des ampoules

scellées. Dans ces conditions l'enzyme reste stable pendant plusieurs mois. Au moment de l'emploi, la solution enzymatique est décongelée lentement à $+4^{\circ}\text{C}$, et sert à préparer des solutions extemporanées de dilution choisie. Le contenu de l'ampoule non utilisé ne peut plus servir ultérieurement. Le substrat est préparé par mélange des solutions suivantes :

Solution d'ADN (R. 1).....	0,75 ml
Solution de tampon Tris-HCl (R. 2) ..	0,15 ml
Solution de sulfate de magnésium (R. 3)	0,12 ml

Après stabilisation dans un bain-marie à 37°C on ajoute 0,25 ml d'une solution soit du milieu biologique à tester (sérum-fraction chromatographique) soit de DNase pure de telle manière que la prise d'essai ait une activité correspondant à 0,2 μg de DNase. Le volume du mélange précédent est complété à 1,5 ml par la solution de NaCl (R. 4).

Un millilitre de mélange réactionnel est composé de :

- 1 mg d'ADN,
- 40 micromoles de tampon Tris,
- 24 micromoles de Mg^{++} .

Ce mélange est maintenu 30 mn au bain-marie à 37°C . On ajoute alors 1,5 ml de solution perchlorique (R. 5) refroidie à 0°C . Le précipité qui se forme est centrifugé à froid à 10 000 tr/mn puis décanté immédiatement. Le désoxyribose qui est ainsi libéré dans le surnageant est dosé par la technique de DISCHE et BURTON (11). Cette technique consiste à laisser en contact dans des conditions précises (18 h à la température du laboratoire et à l'obscurité) 1 ml de surnageant et 2 ml de réactif de DISCHE et BURTON. L'intensité de la coloration est lue à 600 m μ contre un témoin perchlorique sans surnageant.

c) Détermination de l'activité DNasique en fonction de divers facteurs.

α) Après préchauffage à diverses températures.

La détermination de l'activité DNasique des échantillons à tester est effectuée après un chauffage de 30 mn à des températures variables. Ces échantillons, qui sont en solution dans du NaCl 0,14 M, sont refroidis pendant 3 mn dans de la glace fondante. Leur activité DNasique est déterminée par la méthode des « acido-solubles » de KUNITZ telle qu'elle a été décrite dans le chapitre précédent. On utilise habituellement une prise d'essai correspondant à 0,2 μg de DNase cristallisée.

β) En fonction du pH.

Lorsque nous mettons en œuvre la méthode des « acido-solubles » de KUNITZ, l'attaque de l'ADN par la DNase se fait dans un milieu réactionnel comportant 40 micromoles de tampon Tris par millilitre. Le

pH du mélange est alors de 7,3. Lors de la détermination de la courbe d'activité DNasique en fonction du pH, le tampon Tris est remplacé par :

- du tampon phosphate 0,1 M dont le pH varie de 5,8 à 7,4
- du tampon véronal 0,1 M dont le pH varie de 6,6 à 9,2.

γ) En fonction de la concentration en ions activateurs.

La détermination de l'activité DNasique par la méthode de KUNITZ est pratiquée en mettant en œuvre un milieu réactionnel comportant 25 micromoles de Mg^{++} par millilitre. L'ion Mg^{++} est un activateur de la réaction. Nous nous sommes proposé de déterminer l'activité DNasique d'une part en faisant varier la concentration de cet ion activateur de 0 à 80 micromoles par millilitre de mélange réactionnel et d'autre part en le remplaçant par un autre activateur, l'ion Mn^{++} . Nous avons fait varier la concentration de ce dernier de 0 à 40 micromoles pour un millilitre de mélange réactionnel.

d) Application à l'étude de la cinétique de la réaction ADN-DNase.

On prépare à l'avance pour chaque essai, 5 tubes à centrifuger contenant chacun 1 ml de la solution alcoolique d'acide perchlorique (R. 5) qui sont maintenus à 0 °C dans de la glace fondante. Le mélange réactionnel comprend :

solution d'ADN (R. 1)	1 à 4 ml
solution de tampon Tris HCl (R. 2)	2 ml
solution de sulfate de magnésium (R. 3)	1 ml
solution de chlorure de sodium (R. 4)	QSP 11,5 ml

Un millilitre de ce mélange réactionnel contient :

- 0,166 à 0,666 mg d'ADN.
- 66 micromoles de tampon Tris.
- 25 micromoles de Mg^{++} .

Ce mélange est stabilisé au bain-marie à 37 °C. On ajoute 0,5 ml d'une solution soit du milieu biologique (fraction chromatographique) soit de DNase pure afin d'avoir une activité correspondant à 1 µg de DNase par prise d'essai.

On déclenche à ce moment le chronomètre et on prélève immédiatement 2 ml du mélange que l'on verse dans le premier des tubes contenant la solution alcoolique d'acide perchlorique (temps 0). On procède de même à des temps très précis t_1 , t_2 , t_3 , t_4 , qui sont fonction de l'activité attendue c'est-à-dire à la fois de la concentration en enzyme et en substrat. Dans nos mesures expérimentales, ces temps sont généralement compris entre 20 à 35 mn. On attend 10 mn à 0 °C pour permettre la précipitation de l'excès de substrat non attaqué avant de centrifuger

à 10 000 tr/mn puis on décante immédiatement les surnageants. On dose le désoxyribose par la méthode de DISCHE BURTON.

On peut exprimer ces résultats en micromoles de « phosphore ADN » en sachant qu'une concentration de 1 μ g de « phosphore ADN » correspond à une absorption de 0,130 unité de densité optique lue à 600 m μ lors du dosage du désoxyribose. Si le poids moléculaire du phosphore est de 31, la concentration en μ M de « phosphore ADN » sera donc :

$$\frac{x}{0,130 \times 31}$$
, x étant la densité optique lue au spectrophotomètre sur le surnageant acido-soluble.

B. — Fractionnement des protéines sériques ou plasmatiques

I. — TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES SUR CELLULOSES SUBSTITUÉES.

Nous avons utilisé deux types de celluloses substituées : une cellulose anionique : la DEAE cellulose (di-ethyl-amino-éthyl cellulose) titrant 0,90 meq/g, et une cellulose cationique : la CM cellulose (carboxyméthyl cellulose) titrant 0,70 meq/g.

La mise en œuvre de ces chromatographies comporte un certain nombre d'opérations qui ont été décrites par PETERSON et SOBER (67) (83).

1) Préparation des colonnes.

La DEAE cellulose est transformée en base libre par lavage préalable avec une solution de soude 0,1 M. Après un rinçage abondant à l'eau distillée elle est mise en suspension dans le tampon de départ et introduite dans des colonnes cylindriques où elle est tassée avec toutes les précautions d'usage afin d'éviter une répartition irrégulière et un emprisonnement de bulles d'air. Les colonnes sont placées en chambre froide à 4 °C 24 h avant l'élution où elles sont soumises à un lavage continu à l'aide du tampon de départ.

Les chromatographies ont été pratiquées soit sur 3 g de DEAE cellulose dans des colonnes de 40 $\times$ 1,4 cm soit sur 9 g dans des colonnes 50 $\times$ 2 cm.

La CM cellulose est amenée sous forme acide libre par lavage avec de l'acide acétique 0,5 N puis elle est rincée à l'eau distillée jusqu'à obtention d'effluent neutre. Elle est alors équilibrée dans le tampon de départ et mise dans les colonnes. Dans ce cas la séparation chromatographique est effectuée sur 3 g de cellulose.

2) Préparation des échantillons destinés à la chromatographie.

Les échantillons dialysés puis lyophilisés sont repris dans le minimum de tampon de départ. Les liquides biologiques sont dialysés en chambre froide à $+4^{\circ}\text{C}$ contre le tampon de départ pendant 18 h. Le précipité qui pourrait éventuellement se former est éliminé par centrifugation. Les colonnes sont chargées avec un échantillon représentant 120 à 150 mg de protéine pour 3 g de cellulose et de 400 à 500 mg pour 9 g.

3) Elution des colonnes.

Les protéines fixées sur la cellulose sont éluées par des tampons dont la molarité augmente soit progressivement, soit d'une manière discontinue.

a) Elution par gradient discontinu.

Ce procédé est utilisé pour la chromatographie sur CM cellulose. L'éluion est réalisée par passage sur la colonne, de tampons successifs dont le pH et la molarité sont croissants. Le changement de tampon est effectué lorsque la densité optique à 278 m μ de l'éluat tombe au voisinage de zéro. Les tampons utilisés successivement sont :

Acétate de Na		0,02 M	pH = 4,6	
—		0,08 M	pH = 6,0	
Phosphate de Na	...	0,10 M	pH = 7,0	
—	...	0,1 M		} à parties égales pH = 9,2
Solution de NaCl		0,5 M		

b) Elution par gradient continu.

L'utilisation d'éluants de concentration régulièrement croissante permet d'éviter la tendance qu'ont les pics d'éluion à donner des trainées. Les gradients peuvent s'effectuer à pH constant et force ionique croissante ou à pH décroissant et force ionique croissante. De nombreux systèmes permettent d'obtenir des gradients variables (68). Nous avons utilisé le système le plus simple qui nous permet d'obtenir un gradient à pH décroissant et force ionique croissante. L'appareil est constitué de deux récipients montés l'un au-dessus de l'autre. Celui du haut contient le tampon éluant de forte molarité, appelé tampon limite et celui du bas qui constitue la chambre de mélange contient le tampon éluant de faible molarité appelé tampon de départ. Le tampon limite s'écoule goutte à goutte dans la chambre de mélange. Le tampon résultant s'écoule à travers la colonne à chromatographier. On obtient un gradient exponentiel.

On peut calculer théoriquement la molarité du tampon d'une fraction éluee à l'aide de l'équation suivante (69) :

$$C = C_1 - De^{-k}$$

- C est la molarité recherchée dans une fraction donnée ;
 C_1 est la molarité du tampon limite;
D est la différence de molarité entre le tampon limite et le tampon de départ;
 k est le rapport entre le volume d'éluant utilisé jusqu'à l'obtention de cette fraction et le volume du tampon de départ.

Il est bien évident qu'à partir du moment où le tampon limite est épuisé, la molarité du tampon éluant est constante. La chromatographie se fait en chambre froide à $+ 4^{\circ}\text{C}$ le débit est réglé à 20 ml/h. Les fractions de 5 ml sont recueillies par un collecteur automatique.

4) *Analyse des fractions chromatographiques.*

a) Dosage des protéines.

La méthode la plus simple de dosage des protéines de chaque fraction est la mesure de son absorption dans l'ultra-violet à 278 m μ . Cependant cette méthode ne peut être utilisée que pour des déterminations approchées des pics protéiniques car les coefficients d'extinction des protéines à cette longueur d'onde varient dans de larges limites et dépendent de leur composition en acides aminés aromatiques. En effet certaines protéines très pauvres en acides aminés aromatiques peuvent échapper à la caractérisation. Le dosage chimique des protéines par la méthode de Lowry et coll. (57) présente l'avantage d'être plus sensible mais est par contre plus longue à effectuer. Une courbe étalon de Versatol¹ sert de courbe de référence. Nous utilisons ces deux méthodes.

b) Caractérisation électrophorétique.

Les fractions correspondant à un même pic protéinique sont rassemblées, dialysées contre de l'eau distillée, puis lyophilisées. Toutes ces opérations se passent en chambre froide $+ 4^{\circ}\text{C}$. Les fractions lyophilisées sont conservées à $- 20^{\circ}\text{C}$ dans des flacons hermétiquement bouchés jusqu'à leur utilisation. Elles sont dissoutes dans un volume convenable de tampon Tris 0,1 M de pH 7,3 de manière à obtenir une concentration protéinique finale de 20 à 30 mg/ml avant de la soumettre à l'électrophorèse sur gélose et sur gel d'amidon.

c) Mesure de l'activité DNasique.

α) Par la méthode de diffusion en gélose.

Les fractions chromatographiques sont lyophilisées. Elles sont dissoutes dans 0,5 ml de tampon Tris 0,1 M de pH = 7,4. L'activité DNasique est mesurée dans les conditions décrites précédemment.

β) Par la méthode classique de KURNICK.

La méthode précédente permet de déceler et de mesurer rapidement l'activité DNasique de chaque fraction individuelle. Les fractions actives sont alors réunies, dialysées à $+4^{\circ}\text{C}$ pendant 24 h contre de l'eau distillée, puis lyophilisées et dissoutes dans du tampon Tris 0,1 M pH = 7,4 et dosées selon la méthode classique de KURNICK. Si on se reporte à la figure 6 (page 38) on voit que les diverses fractions chromatographiques ont été testées individuellement par la méthode de diffusion en gélose (zone paraissant en noir sur le chromatogramme). Les fractions qui correspondent au pic DNasique I ont été réunies et dosées par la méthode de KURNICK, il en est de même pour le pic II.

II. — TECHNIQUES ÉLECTROPHORÉTIQUES.

1) *Electrophorèse sur papier.*

Cette technique est devenue d'une utilisation trop courante pour que nous nous y attardions. Signalons cependant que la formule de Michaelis a été retenue pour préparer le tampon véronal (0,1 M — pH = 8,6).

2) *Electrophorèse sur gélose.*

Nous avons utilisé essentiellement la micro-méthode sur lame de 75×25 mm. Une solution de 4 ml de gélose à 1,5 % dans du tampon véronal 0,1 M de pH = 8,3 est coulée sur les lames préalablement fixées. Immédiatement après la solidification de la gélose, les produits à tester tels que sérums et fractions protéiniques sont inclus dans une petite cuve cylindrique d'environ 1 mm de diamètre et creusée au milieu de la plaque de gélose. La migration protéinique se fait pendant trois quarts d'heure sous une tension de 5 V/cm. Il faut prendre la précaution d'effectuer cette migration dans une enceinte fermée afin d'éviter la dessiccation très rapide de la gélose. Nous utilisons à cet usage une petite cage en plexiglass couvrant les bacs de conduction du courant électrique renfermant le tampon véronal sodique 0,1 M de pH = 8,3.

La fixation des protéines se fait en immergeant les lames pendant une heure dans de l'eau acétique (2 % d'acide acétique). Les plaques sont ensuite séchées à l'étuve à 37°C jusqu'à dessiccation complète, les protéines sont alors colorées par une solution d'Amido-Schwartz.

3) *Electrophorèse sur gel d'amidon.*

a) Principe.

L'électrophorèse sur gel d'amidon ne diffère pas dans son principe des autres méthodes d'électrophorèse (en veine liquide, sur papier ou

en gélose...). Cependant, la nature du support permet d'obtenir, en plus des variations habituelles dans les vitesses de migration des protéines diversement chargées soumises à un champ électrique constant, un effet de filtration des pores du gel d'amidon vis-à-vis des grosses molécules.

Lors de l'électrophorèse à travers gel d'amidon en deux dimensions on fait migrer dans un premier temps les protéines sériques sur des bandes de papier, puis, dans un second temps les protéines ainsi séparées, à travers gel d'amidon.

L'électrophorèse à travers gel d'amidon est pratiquée suivant la technique de SMITHIES pour la migration uni-dimensionnelle horizontale et verticale (81) (82) et de POULIK et SMITHIES pour la migration bidimensionnelle (71).

b) Localisation des protéines spécifiques.

α) Céruloplasmine.

La céruloplasmine est décelée selon la technique décrite par URIEL (87). Cette α 2 globuline, qui joue le rôle d'un enzyme, oxyde la paraphénylène diamine et donne un corps d'une coloration brune appelé « base de Bándrowski », permettant ainsi sa localisation.

β) Haptoglobines.

L'hémoglobine (Hb) possède la propriété de se lier aux haptoglobines (Hp) pour former un complexe Hb-Hp doué de propriétés peroxydasiques intenses. Cette propriété est mise en évidence par l'action du couple benzidine-eau oxygénée à $\text{pH} = 4,7$. Cette technique est décrite par MORETTI et coll. (61). La quantité d'hémoglobine qu'il convient d'ajouter au plasma afin de saturer les haptoglobines (index d'Hp) est calculée pour chaque échantillon d'après la technique de JAYLE (33).

γ) Transferrines.

Les bêta globulines comprennent une importante fraction fixant le fer, dénommée transferrine chez l'homme. La localisation des bêta globulines peut donc se faire par addition préalable de fer radio-actif (^{59}Fe) au sérum. Le traceur se fixe au niveau des transferrines qui peuvent être ainsi aisément repérées par la suite par scintillation (compteur à scintillation).

— Electrophorèse du sérum marqué.

Un millilitre de sérum reçoit 0,05 ml d'une solution chlorhydrique de chlorure ferrique radio-active de $\text{pH} = 1,5$ titrant 40 μg de fer métallique par millilitre et représentant approximativement une activité de 5 microcuries. Le mélange est porté à l'étuve à 37°C pendant 2 h.

30 μ l de sérum ainsi marqué sont traités par électrophorèse dans les conditions habituelles.

Mesure de la radioactivité par scintillation.

Les fractions protéiniques révélées à l'Amido-Schwartz sont découpées et comptées directement dans un spectromètre à scintillation. La révélation préalable n'a pas d'influence sur les résultats, car la radioactivité reste approximativement constante avant et après la coloration.

4) *Détection de l'activité DNasique.*

La DNase I contenue dans le sérum entier ou dans les fractions chromatographiques est localisée après fractionnement électrophorétique sur gélose ou sur gel d'amidon.

a) Sur gélose.

Le principe en est le suivant : on incorpore de l'ADN à la gélose lors de sa préparation, on effectue l'électrophorèse dans les conditions habituelles, puis on révèle la présence de la DNase par une solution de vert de méthyle.

Mode opératoire.

La solution de gélose habituellement préparée en vue de l'analyse électrophorétique est refroidie à 70 °C. Cinq millilitres d'une solution d'ADN à 2 mg/ml sont alors incorporés à 100 ml de cette solution de gélose. On homogénéise par agitation magnétique puis on coule sur les lames de verre. La migration des milieux à tester est faite en double et est conduite sans modification du protocole expérimental. Les protéines sont révélées sur l'une des lames, la DNase sur l'autre. Cette dernière est révélée par le réactif au vert de méthyle après une incubation de 2 h à l'étuve à 37 °C en atmosphère humide pour éviter la dessiccation de la gélose. Par comparaison avec le témoin protéinique il est facile de repérer la fraction responsable de l'activité DNasique.

b) Sur gel d'amidon.

Nous avons mis en œuvre deux techniques.

α) Technique par diffusion sur un gel de gélose à l'ADN.

La plaque de gel d'amidon ayant servi de support dans la migration de chaque pic protéinique isolé par chromatographie est séparée en deux dans le sens de l'épaisseur. Sur l'une des deux tranches on effectue la coloration des protéines par l'Amido-Schwartz, sur l'autre on coule un volume suffisant de gélose à l'ADN pour obtenir une épaisseur de 2 mm environ. Cette gélose à l'ADN est préparée comme il a été indiqué dans le paragraphe précédent. Si les fractions protéiniques isolées possèdent une activité DNasique, l'enzyme va diffuser du gel d'amidon

dans la gélose à l'ADN au niveau de sa localisation sur le gel d'amidon. Il suffira donc de révéler sa présence par le réactif au vert de méthyle après une incubation de 16 h à l'étuve à 37 °C. Il se formera une zone non colorée à son niveau et on en déduira sa localisation protéinique en la comparant à la plaque de gel d'amidon colorée par l'Amido-Schwartz.

β) Technique par migration directe à travers un gel d'amidon contenant de l'ADN.

Lors de la préparation classique du gel d'amidon on incorpore à la solution d'amidon 5 ml d'une solution d'ADN à 2 mg/ml pour 100 ml de gel d'amidon. Cette opération est effectuée après l'ébullition de la solution d'amidon lorsque la température s'est abaissée à 70 °C. Après la migration électrophorétique pratiquée dans les conditions habituelles on colore l'une des tranches du gel par le réactif au vert de méthyle. Le gel est alors entièrement coloré en vert à l'exception de la zone DNasique. Sur l'autre tranche on colore les protéines par l'amido-Schwartz. On peut de cette manière, localiser la DNase. La migration n'est pas entravée par l'addition d'ADN au gel d'amidon.

III. — TECHNIQUE DE PRÉCIPITATION PAR LE SULFATE D'AMMONIUM.

La précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium est effectuée par addition (progressive et sous agitation magnétique) au sérum d'un volume convenable de solution saturée de sulfate d'ammonium de pH = 5,5. Cette opération est pratiquée à + 4 °C. Au départ, le sérum est ajusté au pH = 5,5 par de l'acide chlorhydrique normal. Après l'adjonction de sulfate d'ammonium on maintient au repos pendant 4 h à + 4 °C. On sépare alors immédiatement le surnageant du précipité par centrifugation. Le surnageant sert à une précipitation ultérieure, le précipité dissous dans le minimum d'eau distillée est dialysé d'abord contre de l'eau distillée puis contre du tampon Tris 0,1 M pH = 7,4. Le dosage de l'activité DNasique est effectué par la méthode de KURNICK.

C. — Caractéristiques générales des animaux expérimentés

Quatre espèces animales différentes ont été expérimentées, ce sont : la souris, le rat, le lapin et le chat.

I. — ORIGINE GÉNÉTIQUE.

1) *Souris*.

Nous avons utilisé deux souches pures de souris la C₃H (HeA possédant le facteur lacté) et la XLII. Elles sont respectivement à leur 38^e et 22^e génération d'élevage en « inbreeding ».

On qualifie de pures ou d'isogéniques des souches animales élevées en « inbreeding », c'est-à-dire obtenues par croisements consanguins frère-sœur suffisamment répétés pour parvenir à l'élimination de presque tous les gènes hétérozygotes. Le pourcentage de réduction des gènes hétérozygotes au cours des générations constitue le coefficient « d'inbreeding ». Ce coefficient est de 19 % à chaque génération et est cumulatif. A la 20^e génération il atteint 98,6 %, il s'approche donc de la valeur asymptotique (21). Il est admis qu'au bout de 20 générations obtenues dans ces conditions, les souris possèdent des caractères génotypiques et phénotypiques fixes.

La souche C₃H pure utilisée fait partie des 201 souches homologuées par « the committee on Standardised Genetic Nomenclature for Mice ». On trouvera dans la nomenclature publiée par cet organisme ses caractéristiques et les renseignements nécessaires.

La souche XLII est en cours d'homologation.

2) Rats.

Nous avons utilisé trois souches pures de rats : Wistar (CF), Sherman et August. Les souches Wistar (CF) et Sherman sont à la limite de l'isogénicité. Elles proviennent de l'élevage du Centre national de sélection des animaux de laboratoire de Gif-sur-Yvette où elles ont été élevées en « inbreeding » respectivement pendant 14 et 16 générations. Avant leur arrivée dans ce centre ces souches étaient déjà élevées en « inbreeding », mais le nombre de générations de consanguinité n'est pas précisé.

3) Autres espèces animales.

Les lapins sont issus d'élevage en colonies fermées. Les chats sont obtenus par capture.

II. — CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES.

Le tableau III résume les caractéristiques générales concernant plus spécialement l'âge, le poids et les conditions de prélèvement du sang des animaux expérimentés.

III. — MILIEUX BIOLOGIQUES.

La plupart des examens ont été effectués sur du sérum. Celui-ci est recueilli par centrifugation du sang une à deux heures après son prélèvement, la rétraction du caillot se faisant à + 4 °C. Certains dosages ont été effectués sur du plasma, notamment lors de la mesure de l'activité DNasique du plasma de souris. Les concentrations d'hépa-

Espèce animale	Age	Poids	Mode de prélèvement du sang
Souris	2 à 3 mois	18 à 27 g	Ponction dans le sinus veineux retro-orbitaire
Rat	5 à 6 mois	250 à 300g	Ponction dans le sinus veineux retro-orbitaire
Lapin	2 à 3 mois	1,5 à 2 kg	Ponction cardiaque
Chat	8 à 30 jours	variable	Ponction cardiaque

TABLeAU III

Caractéristiques générales des espèces animales expérimentées

rine utilisées sont toujours identiques lors de chaque prélèvement de sang et n'ont aucune incidence sur les résultats du dosage de la DNase.

IV. — MISE EN ŒUVRE DE L'EXPÉRIMENTATION GÉNÉTIQUE : OBTENTION DES CROISEMENTS.

Les méthodes expérimentales mises en œuvre au cours de l'étude du conditionnement génétique de la DNase I de souris sont les suivantes :

1) *Obtention des hybrides F_1 .*

Les hybrides F_1 sont obtenus par croisements des souris C_3H et XLII. Une série de croisements a été effectuée :

C_3H mâle $\times$ XLII femelle

2) *Obtention des hybrides F_2 .*

Ils sont obtenus par croisement frère-sœur des hybrides F_1 .

3) *Obtention des « back cross » ou croisements de retour aux parents.*

Les animaux « back cross » sont des animaux obtenus par croisement des hybrides avec les animaux de souche parentale.

Ils sont effectués de la manière suivante :

a) *Retour aux C_3H (« back cross » n° 1) :*

Mâle $F_1 \times$ femelle C_3H .

b) *Retour aux XLII (« back cross » n° 2) :*

Femelle $F_1 \times$ Mâle XLII.

Nous avons dressé sur le tableau IV le schéma des différents croisements effectués.

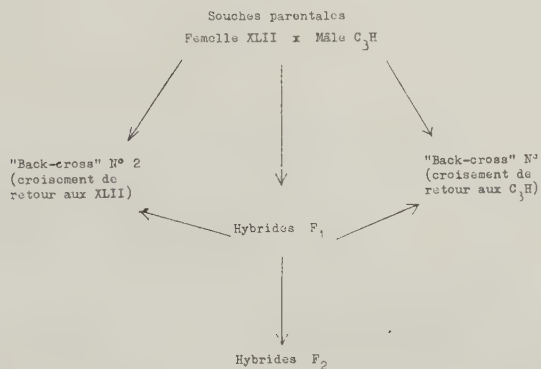


TABLEAU IV

Représentation schématique des divers croisements effectués entre les souris de souches C_3H et XLII

TROISIEME PARTIE

REPARTITION DES ACTIVITES DESOXYRIBONUCLEASIQUES CHEZ QUELQUES MAMMIFERES SUPERIEURS

Nous nous sommes proposé dans cette partie du travail de mesurer l'activité de la DNase I dans les sérums de différents mammifères supérieurs. Ces déterminations ont eu pour but :

- de sélectionner les espèces animales dont le sérum ou le plasma était particulièrement riche en DNase afin de poursuivre ultérieurement une étude biochimique et enzymatique ;
- de déceler le cas échéant des différences quantitatives ou qualitatives entre diverses souches d'une même espèce animale. La mise en évidence de tels faits inciterait à entreprendre une étude génétique de cette DNase.

I. — Résultats

Les sérums de 5 espèces différentes de mammifères supérieurs ont été testés : l'homme mâle, le chat, le lapin, le rat et la souris. De plus chez le rat et la souris les dosages de DNase ont été effectués sur les souches pures choisies. (Rats Wistar, Sherman et August, souris XLII et C₃H.) Les résultats, qui sont donnés en unités KURNICK/ml (UK/ml) sont reportés dans les tableaux V, VI, VII, VIII, IX.

Nombre de sérums humains testés	Valeurs extrêmes (UK/ml)	Valeur moyenne (UK/ml)	σ_m
98	10×10^{-4} Δ 130×10^{-4}	50×10^{-4}	5×10^{-4}

TABLEAU V

Valeurs de l'activité DNasique en unité Kurnick/ml de sérums humains de sexe masculin. Les sujets testés étaient apparemment en bonne santé. σ_m représente l'écart-type de la moyenne

SEXE	Numéro des Chats	CHATS ADULTES			CHATONS (8 à 30 jours)		
		UK/ml	m	σm	UK/ml	m	σm
Mâle	1	2,0			2,30		
	2	2,62			1,95		
	3	2,10			1,60		
	4	3,0	2,30	0,16	2,80	2,16	0,25
	5	1,85					
	6	2,0					
	7	2,55					
Femelle	1	2,10			1,95		
	2	1,44			2,05		
	3	1,30			1,80		
	4	1,75			1,85		
	5	1,65			1,82		
	6	2,35			1,85		
	7	2,50	1,81	0,10	2,05	1,93	0,04
	8	2,0			2,08		
	9	2,07					
	10	1,40					
	11	1,20					
	12	2,0					

TABLEAU VI

Valeurs comparées de l'activité DNasique en unité Kurnick/ml
du sérum de chats adultes et de chatons mâles et femelles
 σm représente l'écart-type de la moyenne m

SEXE	Numéro des lapins	UK/ml	m	σm
Mâle	1	0,09		
	2	0,11		
	3	0,13		
	4	0,14		
	5	0,11		
	6	0,12		
	7	0,11		
	8	0,11		
	9	0,11	0,10	0,015
	10	0,11		
	11	0,11		
	12	0,11		
	13	0,13		
	14	0,09		
	15	0,09		
	16	0,08		
	17	0,14		
	18	0,07		
Femelle	1	0,09		
	2	0,09		
	3	0,09		
	4	0,07	0,09	0,011
	5	0,06		
	6	0,14		

TABLEAU VII

Valeurs comparées de l'activité DNasique en unité Kurnick/ml
du sérum de lapins mâles et femelles
 σm représente l'écart-type de la moyenne m

SEXE	N° des Rats	SOUCHE WISTAR			SOUCHE SHERMAN			SOUCHE AUGUST		
		UK/ml	m	σm	UK/ml	m	σm	UK/ml	m	σm
Mâle	1	0,26			0,12			1,40		
	2	0,40			0,32					
	3	0,25			0,20			1,60		
	4	0,20			0,05			0,65		
	5	0,35			0,80			0,60		
	6	1,0			0,05			0,20		
	7	0,29	0,54	0,10	0,13	0,23	0,06	0,35	0,68	0,19
	8	1,17			0,14			0,35		
	9	1,05			0,35			0,30		
	10	0,60			0,05					
	11	0,40			0,25					
	12	0,50			0,45					
Femelle	1	2,50			1,50			0,90		
	2	2,40			1,30			0,95		
	3	2,80			1,55			0,25		
	4	2,0			0,70			1,15		
	5	1,05			1,40			0,30		
	6	2,70	1,98	0,23	1,20	1,31	0,11	0,25	0,81	0,18
	7	2,60			1,55			0,35		
	8	2,30						1,60		
	9	0,50						1,55		
	10	0,90								
	11	2,70								
	12	0,90								

TABLEAU VIII

*Valeurs comparées de l'activité DNasique en unité Kurnick/ml
du sérum de rats mâles et femelles
de souches WISTAR, SHERMAN et AUGUST
 σm représente l'écart-type de la moyenne m*

Souches	Sexe	Nombre de Souris testées	Valeurs extrêmes UK/ml	Valeurs moyennes UK/ml	σm
C ₃ H	Mâle	50	0,03 à 0,31	0,12	0,009
	Femelle	50	0,03 à 0,24	0,10	0,007
XLII	Mâle	40	0,16 à 0,65	0,29	0,01
	Femelle	40	0,17 à 0,49	0,29	0,01

TABLEAU IX

*Valeurs comparées de l'activité DNasique en unité Kurnick/ml
des plasmas de souris mâles et femelles de souches C₃H et XLII
 σm représente l'écart-type de la moyenne m*

I. — Discussion

1) Le chat et le rat Wistar femelle sont les espèces animales qui possèdent les plus fortes concentrations sériques de DNase I. L'activité DNasique est 200 à 250 fois supérieure à celle décelée dans le sérum humain.

Ces résultats confirment ceux obtenus par KURNICK (42) puis BOHUON (9) qui avaient constaté la pauvreté du sérum humain et l'extrême richesse du sérum de chat en DNase I. En effet ce dernier correspondait à l'activité de 3 μ g de DNase cristallisée par millilitre et était 100 fois supérieure à celle du sérum humain.

Il faut ajouter que des sérums d'homme souffrant de diverses affections néoplasiques ont été testés. Les résultats concernant le taux de DNase I sont contradictoires suivant les auteurs. Pour KURNICK (42) il ne subit aucune variation sensible tandis que pour WROBLEWSKI et coll. (89) il est abaissé.

Les résultats obtenus par KURNICK (42) sont également comparables aux nôtres en ce qui concerne le lapin. Par contre chez le rat et la souris nos résultats sont peu comparables car cet auteur n'a testé qu'un nombre très limité d'animaux (5 sérums de rat et 1 de souris) et ceci sans spécification de la souche ni du sexe.

2) Il n'existe pas de différence significative de l'activité DNasique entre les animaux mâles et femelles chez le lapin, la souris, le chat et le rat de souche August. Il ne semble pas y avoir non plus de différence entre les taux de DNase trouvés chez les chats adultes et chez les châtons âgés de 8 à 30 j. Par contre il apparaît une différence notable chez les rats Wistar et Sherman, les sérums des animaux femelles étant les plus riches.

3) Les résultats obtenus chez la souris sont particulièrement intéressants. Si les différences quantitatives entre mâles et femelles ne sont pas apparentes, elles apparaissent par contre incontestablement entre les souches C₃H et XLII.

4) Nous présentons dans le tableau X quelques séries de résultats obtenus chez le chat, qui mettent en évidence les variations du taux de DNase sérique après plusieurs prélèvements effectués successivement tous les 15 j. On remarquera que la concentration sérique de DNase est relativement constante dans le sérum de cette espèce animale.

5) Dans leur milieu naturel, c'est-à-dire dans le sérum, les DNases du chat et du rat sont stables, leurs propriétés enzymatiques se maintiennent pendant un temps relativement long. Des sérums de chat et de rat conservés à + 4 °C pendant 45 j ont gardé intacte leur activité DNasique.

Sexe	Numéro des Chats	Activité DNasique (UK/ml) suivant les prélèvements successifs				
		1	2	3	4	5
Mâle	1	1,90	1,85	1,40	2,20	2,70
	2	2,50	2,40	2,80	2,80	
	4	3,0	3,20	2,80		
Femelle	1	2,05	2,15			
	2	1,20	1,50	1,50	1,55	
	4	1,50	1,70	2,05		
	5	1,70	1,50	1,50	1,90	

TABLEAU X

*Valeurs comparées de l'activité DNasique du sérum de chats adultes
suivant les prélèvements effectués successivement tous les 15 jours*

6) Le dosage de la DNase I du sérum ou du plasma est effectué en présence d'un certain nombre d'effecteurs (activateurs ou inhibiteurs) de la réaction enzymatique. En effet FEINSTEIN et coll. (22) ont décrit un activateur de DNase I dans le plasma de rat de même que récemment BERGER et MAY (8) viennent de mettre en évidence un inhibiteur de DNase I dans le plasma de ce même animal. De plus HERRIOT et coll. (30) puis FESTY et coll. (23) ont décrit un inhibiteur pouvant être libéré à partir de certains éléments figurés du sang lors de son prélèvement et donc susceptible d'interférer dans toutes les déterminations *in vitro*. Dans ces conditions on peut se demander si la concentration de DNase I du plasma ou du sérum calculée *in vitro* correspond réellement aux concentrations *in vivo*. Par ailleurs on pourrait expliquer en partie les variations et l'inconstance physiologique des taux de DNase chez le rat, particulièrement dans la souche August, par la libération plus ou moins grande d'inhibiteur au cours des prélèvements. A ce sujet on peut rappeler que GOSSE et coll. (26) (65) ont montré que la vitesse de dégradation de l'ADN par la DNase neutre plasmatique chez le lapin est très rapide *in vivo* et par contre lente *in vitro*, et que la concentration de DNase calculée *in vitro* représente bien la concentration de cet enzyme *in vivo*. La présence d'un inhibiteur dans le plasma *in vitro*, libéré des éléments figurés du sang lors du prélèvement, permettrait d'expliquer ce phénomène. L'action de l'héparine est à exclure. Il est utile de signaler que dans nos divers essais nous n'avons pas observé de différence d'activité DNasique :

- d'une part lorsqu'il s'agissait de sérum ou de plasma,
- d'autre part lorsque le sérum ou plasma était hémolysé ou non.

QUATRIEME PARTIE

ETUDES BIOCHIMIQUES ET ENZYMOLOGIQUES DE LA DESOXYRIBONUCLEASE I DU SERUM DE CHAT, DE RAT ET DE SOURIS

Cette partie de notre travail est consacrée à l'étude biochimique et enzymologique de la DNase I, rencontrée chez le chat, le rat Wistar femelle et la souris C₃H et XLII. Un certain nombre de problèmes se sont posés au cours de cette étude.

1^o Tout d'abord il s'agissait d'établir si les DNases rencontrées dans les sérums du chat, du rat et de la souris présentaient des critères biochimiques et enzymatiques identiques.

2^o Nous avons mis en évidence deux fractions DNasiques dans le sérum de chat. Il devenait alors intéressant de savoir si ces deux fractions DNasiques étaient douées de propriétés enzymatiques identiques ou différentes et d'en déterminer les caractéristiques.

3^o Les différences quantitatives de l'activité DNasique mises en évidence entre les deux souches de souris isogéniques C₃H et XLII nous incitèrent d'une part à essayer de déterminer par des méthodes biochimiques et enzymatiques des différences qualitatives entre la DNase I du sérum de ces deux souches, et d'autre part à entreprendre une étude du conditionnement génétique de cette DNase I. Cette étude génétique sera développée dans la cinquième partie de ce mémoire.

4^o Les réactions enzymatiques sont sous l'influence et même sous le contrôle des effecteurs qui interviennent, soit en activant, soit le plus souvent en inhibant ces réactions surtout lorsque celles-ci se font en présence d'un milieu protéinique complexe. Il devenait donc important de préciser les caractéristiques d'une inhibition.

Il faut ajouter que nous avons complété cette étude en étudiant comparativement les DNases de chat, de rat, et de souris avec la DNase I de pancréas cristallisée par KUNITZ. Cette dernière est mise en solution

dans un complexe protéinique pratiquement dépourvu d'activité DNasique et constitué par du sérum humain.

A. — Différenciation électrophorétique des diverses DNases

Ce chapitre sera consacré aux études électrophorétiques de la DNase I contenues dans le sérum de chat, de rat Wistar femelle et des souris C₃H et XLII en comparant leur vitesse de migration à celle des protéines connues telles que les haptoglobines, la céruloplasmine et les transferrines. Ces DNases qui sont plongées dans un mélange protéinique aussi complexe que le sérum, sont présentes en très faible quantité et peuvent subir des perturbations dans leur migration.

I. — RÉSULTATS.

1) Mobilité de la DNase en gélose.

Nous présentons une série de schémas qui rendent compte de la mobilité des fractions DNasiques du chat, du rat Wistar, et des souris C₃H et

FRACTIONS N°	CHAT	RAT WISTAR	SOURIS C ₃ H et XLII
1	γ globuline	γ globuline	γ globuline
2	β lipoprotéine	α ₁ globuline	α ₂ globuline
3	α ₁ globuline	Transferrine	Transferrine DNase
4	α ₂ globuline	Transferrine	Transferrine
5	Transferrine	α ₂ globuline Haptoglobine DNase	α ₂ globuline Haptoglobine Céruloplasmine
6	Transferrine	α ₂ globuline	α ₁ globuline
7	α ₂ globuline	α ₂ globuline Céruloplasmine	α ₂ globuline
8	DNase α ₂ globuline Céruloplasmine	Albumine	Albumine
9	α ₁ globuline		α ₁ globuline
10	α ₁ globuline		
11	Albumine		

TABLEAU XI

Etude comparative du fractionnement par électrophorèse sur gel d'amidon des sérums de chat, de rat Wistar et de souris C₃H et XLII. Les fractions sont numérotées en allant de la cathode vers l'anode et correspondent aux bandes schématisées sur la figure 3

XLII. Les schémas inférieurs de la figure 3 représentent ces migrations électrophorétiques effectuées sur de la gélose. La migration de la DNase est comparée à la migration des protéines sériques. Il apparaît clairement que ces DNases appartiennent au groupe des α_2 globulines. La DNase du sérum de souris C₃H et la DNase du sérum de souris XLII ont exactement la même vitesse de migration.

2) Mobilité de la DNase à travers gel d'amidon.

Pour éviter une énumération fastidieuse des différentes fractions protéiniques obtenues par électrophorèse sur gel d'amidon nous préférons présenter les résultats dans un tableau comparatif (tableau XI) explicité par des schémas des protéinogrammes (schémas supérieurs de la figure 3). Les diagrammes électrophorétiques en gel d'amidon du sérum de souris C₃H et du sérum de souris XLII sont identiques. Nous avons donc tracé un seul schéma pour ces deux souches animales.

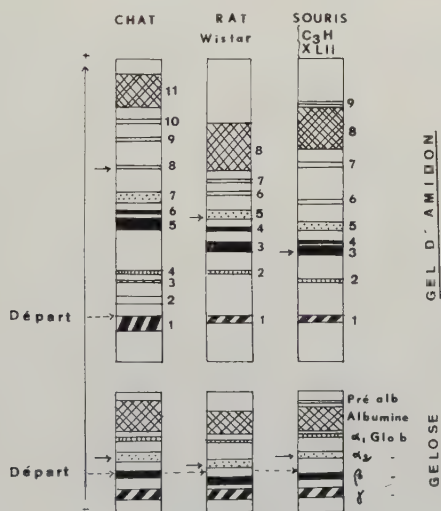


FIG. 3. — Fractionnement comparatif par électrophorèse en gel d'amidon et en gélose des protéines sériques du chat, du rat Wistar, et de la souris C₃H et XLII. Les flèches en trait plein indiquent la localisation des diverses activités DNasiques

La figure 4 représente un schéma de la localisation de la DNase du sérum de souris C₃H et XLII après électrophorèse bidimensionnelle en gel d'amidon. Ces trois espèces animales possèdent deux fractions voisines mais nettement distinctes qui fixent le radio-élément (figure 5). Ces espèces animales possèdent donc deux transferrines, contrairement

à de nombreux mammifères chez lesquels on n'a pu mettre en évidence qu'une seule (74).

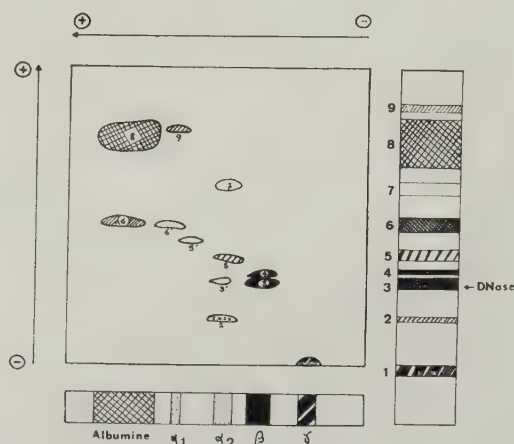


FIG. 4. — Schéma de la localisation de la DNase sérique de souris de souches C₃H et XLII après électrophorèse bidimensionnelle en gel d'amidon.

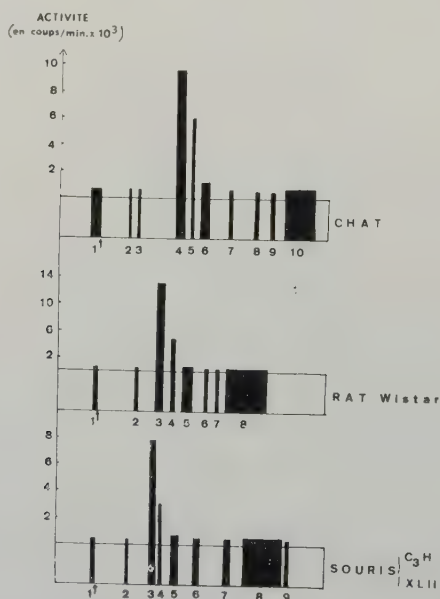


FIG. 5. — Étude comparative de la répartition de la radio-activité au niveau des diverses fractions électrophorétiques du gel d'amidon des sérums de chat, de rat Wistar, de souris (C₃H et XLII) incubés avec du ⁵⁹Fe

II. — DISCUSSION.

1) *Discussion des techniques.*

L'interprétation des résultats concernant la localisation de l'activité DNasique en gel d'amidon est délicate. Ce fait est dû à la méthode de détection de la DNase fondée sur le principe de diffusion. Dans ces conditions, il devient illusoire de déterminer avec certitude l'emplacement exact de la fraction DNasique (mise en cause) après électrophorèse sur gel d'amidon, étant donné le rapprochement étroit qui existe entre les diverses fractions séparées. En outre le pouvoir résolutif du gel d'amidon est souvent variable d'une expérience à l'autre.

2) *Discussion des résultats.*

Il ressort des résultats que nous venons de résumer que dans les diverses espèces les fractions qui possèdent une activité DNasique ont une mobilité électrophorétique différente et accompagnent donc des fractions sériques différentes. Néanmoins on peut affirmer que ces DNases sont révélées au niveau des α_2 globulines des sérums de chat, de rat et de souris. L'examen de la figure 3 montre que les légères différences de mobilité des DNases sur gélose sont cependant beaucoup plus accentuées sur gel d'amidon. La DNase du sérum de chat est révélée au niveau d'une fraction protéinique nettement plus mobile que celle du sérum de rat et de souris. En effet la DNase de cette dernière espèce est particulièrement peu mobile sur gel d'amidon. Elle migre au niveau de la fraction n° 3 considérée comme une transferrine. Mais cette fraction est hétérogène, la migration bidimensionnelle permet de la séparer en une fraction de la mobilité des β globulines et en une fraction de la mobilité des α_2 globulines (fraction 3' du schéma de la figure 4) qui est enzymatiquement active. La DNase de ces animaux, qui possèdent, comme nous le verrons dans les chapitres suivants, plusieurs caractéristiques de la DNase pancréatique cristallisée par KUNITZ, se trouve liée plus ou moins étroitement à une protéine de mobilité analogue à celle des α_2 globulines. En effet, si on fait migrer sur gel d'amidon de la DNase cristallisée on constate qu'elle est hétérogène et qu'elle se fractionne en quatre bandes. Il nous a seulement été possible de mettre en évidence globalement les propriétés enzymatiques de ces bandes. Si on effectue une migration comparative toujours sur gel d'amidon de la DNase I cristallisée et du sérum humain + DNase I cristallisée, il apparaît que les bandes actives de la DNase incorporée au sérum humain migrent nettement moins loin que les fractions (enzymatiquement) actives de la DNase I pure.

A la suite de ces faits on peut conclure que les DNases sériques sont

en toute probabilité associées aux protéines avec lesquelles elles forment des complexes. L'étude comparative de leur mobilité devient difficile, leur localisation réelle imprécise.

B. — Essais de purification

Pour compléter cette étude nous avons recherché les méthodes de fractionnement qui nous donneraient la possibilité de purifier et d'augmenter l'activité spécifique des préparations.

Dans ce but, nous avons d'abord essayé les méthodes de précipitation par le sulfate d'ammonium à saturation, qui nous ont donné des résultats médiocres, nous avons alors eu recours aux méthodes de chromatographie sur celluloses substituées telles que DEAE et CM celluloses.

I. — RÉSULTATS.

Nous nous proposons d'énoncer en premier lieu les résultats obtenus chez le chat dont le sérum, particulièrement riche en DNase, a fait l'objet d'une étude plus approfondie.

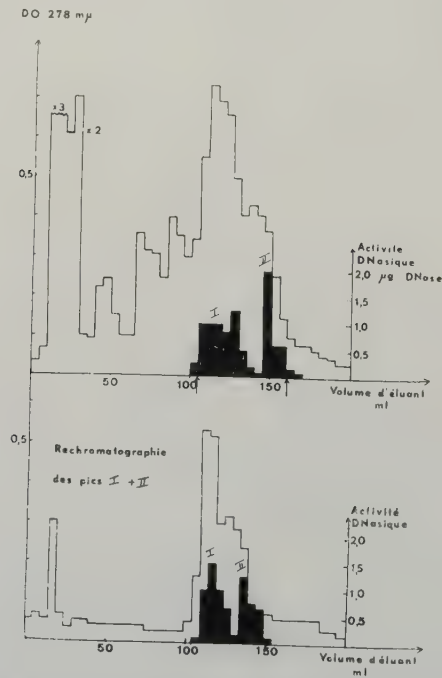


FIG. 6. — Analyse chromatographique sur DEAE cellulose du sérum total de chat (*en haut*). Chromatographie des pics I + II dans les mêmes conditions (*en bas*). En noir les activités DNasiques

1) *Fractionnement chromatographique du sérum de chat.*

a) Distribution Protéinique.

Trente chromatographies ont été effectuées sur DEAE cellulose avec un système d'élution continue portant sur les sérums de 12 chats différents. La reproductibilité des résultats est très satisfaisante, l'élution des différentes fractions protéiniques se faisant rigoureusement à une même concentration ionique et à un même pH du tampon. C'est ainsi que les fractions protéiniques isolées lors d'une première chromatographie, sont éluées dans les mêmes conditions de force ionique et de pH lors de leur chromatographie ultérieure (figure 6). Le taux du recouvrement des protéines s'élève d'une part à $80 \% \pm 6$ lorsqu'il est calculé d'après l'absorption à 2780 Å et d'autre part à $83 \% \pm 9$ lorsque les protéines sont dosées par la méthode de LOWRY. La chromatographie sur DEAE cellulose fournit pour l'ensemble des protéines sériques du chat, 6 fractions principales.

La figure 7 représente le diagramme chromatographique habituellement observé, les 6 fractions principales obtenues sont numérotées de A à F. Chaque fraction ainsi préparée est analysée par électrophorèse sur gélose et sur gel d'amidon.

La figure 7 représente également le schéma de cette séparation électrophorétique comparativement à du sérum pur.

L'hétérogénéité des pics chromatographiques décelée surtout par l'électrophorèse en gel d'amidon était prévisible, car l'élution chromatographique d'un mélange complexe de protéines tel que celui existant dans le sérum ne permet pas de les séparer en un aussi grand nombre de fractions que par électrophorèse sur gel d'amidon. C'est pourquoi chaque pic chromatographique est hétérogène à l'analyse électrophorétique.

Nous allons présenter l'analyse électrophorétique de chaque pic chromatographique. Le pic n° A est exclusivement composé de γ globulines. Le pic n° B est formé de traces de γ globulines et du composant n° 4 du gel d'amidon ayant sur gélose la mobilité des β globulines. Le pic n° C est formé des composants nos 4 et 5 du gel d'amidon, ce sont les transferrines. Le pic n° D est constitué par 5 composants bien déterminés du gel d'amidon 2-3-8-9-10. La fraction 10 ayant la mobilité des albumines, se trouve d'ailleurs en très faible concentration et présage de l'élution prochaine des albumines. La fraction n° 7 est présente à l'état de traces. Le pic n° E est constitué par la majeure partie des albumines. L'électrophorèse en gel d'amidon révèle la présence d'une fraction, invisible sur le diagramme du sérum total, dont la vitesse de migration est intermédiaire de celle des fractions 3 et 4. En outre on peut observer de très faibles quantités des fractions 5-6 et 7 et des

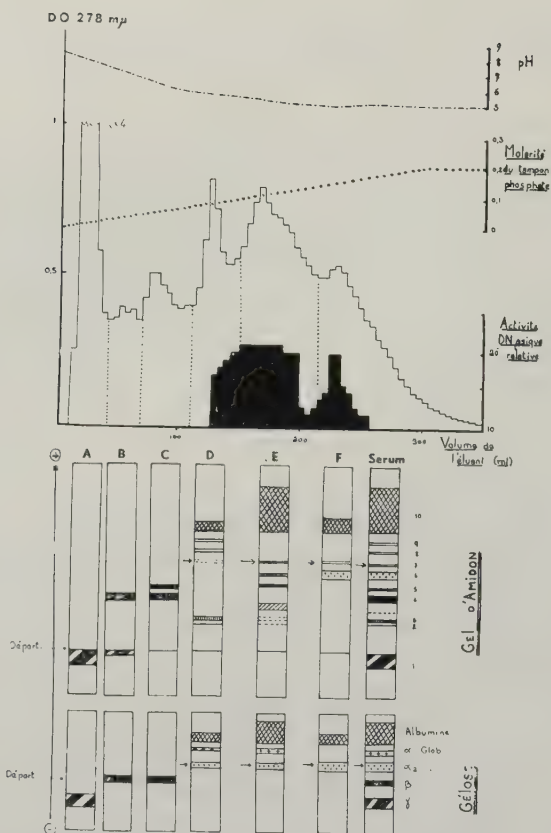


FIG. 7. — Chromatographie du sérum de chat sur DEAE-cellulose par élution continue (en noir activité DNasique relative). Tampon de départ : 300 ml de tampon phosphate 0,01 M pH = 8,4. Tampon limite : 300 ml de tampon phosphate 0,3 M pH = 4,3. — Analyse électrophorétique des fractions (la flèche indique la localisation de l'activité DNasique en électrophorèse)

traces des fractions 2 et 3. Sur gélose, le pic se résout en albumines, α_1 et α_2 globulines. Le pic F renferme une faible proportion d'albumine et la presque totalité des fractions nos 6 et 7 qui se comportent sur gélose comme des α_2 globulines.

Comme on le verra dans le paragraphe suivant, l'activité DNasique I des diverses fractions chromatographiques se répartit sur deux pics protéiniques dénommés pic I et pic II. Ces deux pics voisins n'ont pas pu être individualisés en deux fractions différentes par électrophorèse sur gel d'amidon, parce que la méthode de détection de l'activité DNasique est fondée sur le principe de diffusion.

La chromatographie du sérum de chat sur CM cellulose donne les résultats que nous reproduisons sur la figure 8.

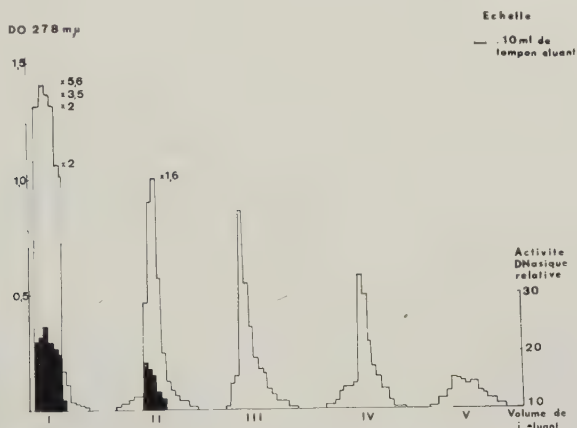


FIG. 8. — Chromatographie du sérum de chat sur CM-cellulose par élution discontinue (en noir, activité DNasique relative)

Tampons utilisés :

- I. — Tampon acétate Na 0,02 M pH = 4,6.
- II. — Tampon acétate Na 0,08 M pH = 6,0.
- III. — Tampon phosphate Na 0,1 M pH = 7,0.
- IV. — Tampon phosphate Na 0,1 M + ClNa 0,5 M à parties égales pH = 9,2.
- V. — Tampon carbonate Na 0,3 M pH = 10,6.

b) Distribution de l'activité DNasique.

L'activité DNasique de chaque fraction chromatographique est recherchée par la méthode de diffusion en gélose.

Nous obtenons alors 2 pics très nets d'activité DNasique. Ces pics qui sont représentés en noir sur les chromatogrammes ont été établis soit en portant directement sur le graphique les valeurs du diamètre de diffusion de la DNase (figure 7), soit par conversion de ces valeurs en équivalent de μg de DNase (figure 6) à l'aide d'une courbe d'étalonnage (figure 2). Ces pics DNasiques sont entièrement élués des colonnes de DEAE cellulose par du tampon phosphate de molarité comprise entre 0,10 et 0,18 et de pH compris entre 5,0 et 5,5. Si on effectue une chromatographie de ces deux pics dans les mêmes conditions, on obtient les mêmes résultats, c'est-à-dire que les fractions DNasiques sont éluées aux mêmes pH du tampon (figure 6). Le rendement en activité enzymatique obtenu lors des chromatographies est reporté sur le tableau XV. Lors de la deuxième chromatographie le rendement atteint à peine 50 %.

Par chromatographie du sérum de chat sur CM cellulose nous obtenons encore 2 pics d'activité DNasique, dont le premier est élué par du tampon acétate de sodium 0,02 M de pH = 4,6 et le second, par le même tampon, mais de molarité 0,08 M de pH = 6,0 (figure 8).

c) Purification des fractions DNasiques.

α) Par précipitation par le sulfate d'ammonium puis chromatographie.

Nous résumons dans le tableau XII les étapes et les principaux résultats obtenus lors de la concentration des fractions DNasiques par fractionnement au sulfate d'ammonium à pH = 5,5 avant passage sur

λ de saturation en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	Protéine (mg)	Activité μg DNase	Activité spécifique μg DNase/mg protéine	Facteur d'en- richissement	Rendement Total %
Sérum total	1000,0	17,45	0,172	1	
I : 30 %	183,0	24,0	0,131	0,75	
II : 30 et 40 %	107,1	62,5	0,584	3,40	
III : 40 et 50 %	124,0	24,0	0,193	1,15	
IV : 50 et 60 %	145,0	7,80	0,046	0,27	
V : Surnageant final	440,9	0			
I + II + III + IV		117,30			68,1 %

TABLEAU XII
Précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium du sérum de chat et activité DNasique exprimée en unité Kurnick (U_K) des diverses fractions obtenues

colonne. C'est l'essai qui nous a fourni le meilleur résultat. Dans les autres essais à ce pH ou à pH 6,5 et 7,3 les rendements étaient très inférieurs (56 %, 42 %, 30 %). La presque totalité de la DNase précipite entre 30 et 50 % de saturation en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à pH = 5,5. La fraction qui précipite entre 30 et 40 % de sulfate d'ammonium est la plus pure. Une nouvelle précipitation a été effectuée à partir de cette fraction. Les fractions obtenues ont alors une activité spécifique extrêmement faible. Dans le tableau XII les activités DNasiques sont traduites en microgramme de DNase cristallisée : une unité Kurnick correspond à 5 μg de DNase. Les activités spécifiques sont exprimées en microgramme de DNase par milligramme de protéine.

Si on effectue la chromatographie sur DEAE cellulose de la fraction précipitant entre 30 et 40 % de saturation en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, les fractions chromatographiques se répartissent en deux pics d'activité DNasique.

Les valeurs des activités spécifiques de ces 2 pics, calculées comparativement au sérum de départ et à la fraction de précipitation par le sulfate d'ammonium, sont insérées dans le tableau XIII.

Etales de purification	Protéines (mg)	Activité $\mu\text{g DNase}$	Activité Spécifique $\mu\text{g DNase/mg protéine}$	Facteur d'enrichissement
Sérum pur	1000	172,5	0,172	1
Précipité 30 à 40 %	107	62,5	0,584	3,40
Pic I	26	28,0	1,07	6,2
Pic II	16	13,0	1,23	7,1

TABLEAU XIII

Essai de purification de la DNase I du sérum de chat par précipitation par le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ puis chromatographie sur DEAE cellulose. Activités spécifiques obtenues. Les activités DNasiques initialement calculées en unité Kurnick ont été transcrites en μg de DNase cristallisée sachant qu'une unité correspond à cinq μg de DNase cristallisée

β) Par chromatographie directe.

Les résultats obtenus lors de la chromatographie directe du sérum de chat sur DEAE cellulose sont reportés dans le tableau XIV. L'activité spécifique finale des deux pics (I et II) d'activité DNasique a été calculée de la même manière que précédemment.

Chromato N°	Activité Spécifique du sérum ($\mu\text{gDNase/mg Protéine}$)	Protéine (mg)		Activité ($\mu\text{g DNase}$)		Activité Spécifique ($\mu\text{gDNase/mg Protéine}$)		Facteur d'enrichissement Pic DNasique	
		Pic DNasique I	II	Pic DNasique I	II	I	II	I	II
42	0,10	25,0	4,6	7,0	3,0	0,30	0,65	3,0	6,5
45	0,10	8,0	2,0	4,2	2,8	0,50	1,40	4,5	14,0
64	0,15	45,0	23,0	20,0	19,0	0,45	0,83	3,0	5,5
68	0,19	15,0	11,0	20,0	22,0	1,33	2,0	7,0	10,5
76	0,20	40,0	36,0	10,0	36,0	0,25	1,0	1,25	5,0
81	0,14	35,0	25,0	14,0	26,0	0,42	0,93	3,0	6,6

TABLEAU XIV

Essai de purification de la DNase I du sérum de chat par chromatographie directe sur DEAE-cellulose. Activités spécifiques obtenues. Le facteur d'enrichissement est calculé par rapport à l'activité spécifique du sérum. La chromatographie n° 45 est une chromatographie des pics DNasiques I et II obtenus lors de la chromatographie n° 42

Parfois les expériences de chromatographies successives nous ont permis d'obtenir une fraction dont l'activité spécifique était multipliée par 4,5 et 14 pour les pics I et II respectivement par rapport à l'activité spéci-

fique DNasique initiale du sérum. Cependant lors de ces rechromatographies successives la DNase devient de plus en plus fragile et les rendements sont très faibles.

2) Fractionnement chromatographique du sérum de Rat Wistar.

Lors de cette expérience nous avons utilisé du sérum de rat femelle puisqu'il est environ quatre fois plus riche en DNase I que le sérum de mâle.

La figure 9 représente le tracé protéinique obtenu après élution chromatographique en continu d'un sérum de rat Wistar femelle.

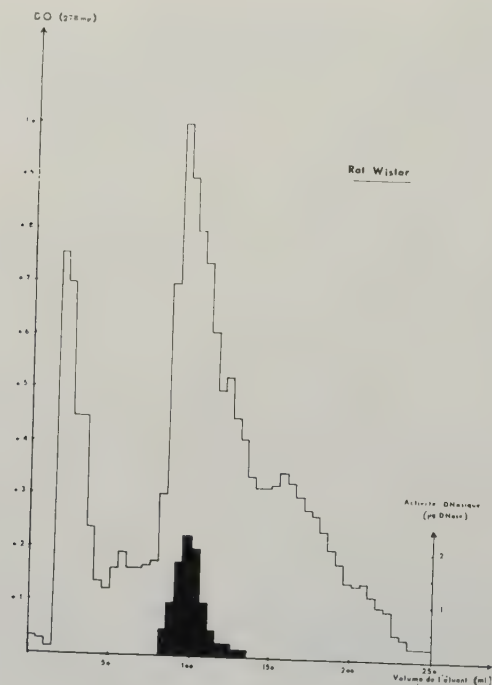


FIG. 9. — Analyse chromatographique sur DEAE-cellulose par élution continue du sérum total de rat Wistar femelle (en noir activité DNasique)
 Tampon de départ : 250 ml de tampon phosphate 0,01 M pH 8,4.
 Tampon limite : 125 ml de tampon phosphate 0,3 M pH = 4,3.

Les fractions DNasiques se répartissent, en un seul pic élué par du tampon phosphate de molarité comprise entre 0,09 et 0,12 dont le pH est voisin de 5,5. On récupère 77 % des protéines et 72 % de l'activité DNasique.

3) *Fractionnement chromatographique du sérum de souris C₃H et de souris XLII.*

La figure 10 représente le tracé protéinique et la répartition de l'activité DNasique obtenus par chromatographie sur DEAE cellulose des sérums de souris C₃H et XLII. La DNase I des deux sérums est éluée par du tampon phosphate de molarité voisine de 0,15 et de pH compris entre 5,8 et 6,0. Dans les deux cas le rendement protéinique est de 72 % et le rendement enzymatique voisin de 76 %.

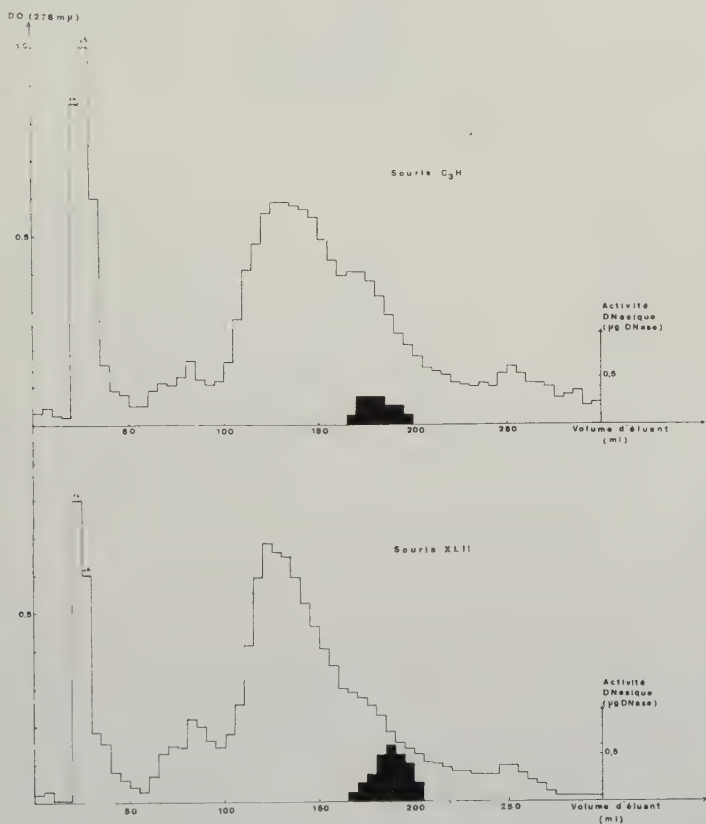


FIG. 10. — Chromatographie des sérums de souris de souche C₃H et XLII sur DEAE-cellulose par élution continue (en noir activité DNasique).

— Tampon de départ : 250 ml de tampon phosphate 0,01 M pH = 8,4.
— Tampon limite : 125 ml de tampon phosphate 0,3 M pH = 4,3.

4) *Fractionnement chromatographique de la DNase I cristallisée de KUNITZ.*

Deux diagrammes chromatographiques sont représentés sur la figure 11. Le schéma du haut représente le tracé protéinique et la répartition de

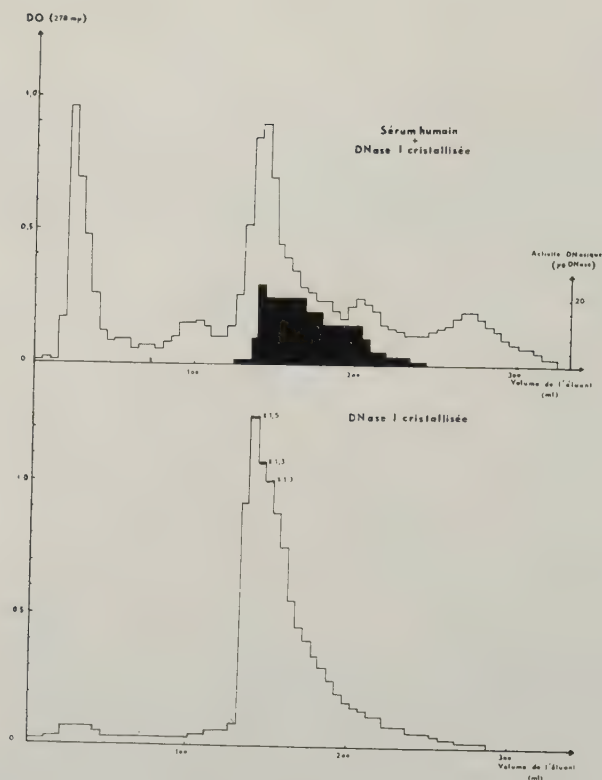


FIG. 11. — Analyse chromatographique sur DEAE-cellulose par élution continue :

- de sérum humain + DNase I cristallisée (140 mg de protéine, 400 μ g d'enzyme) (en noir activité DNasique),
- de DNase I cristallisée (60 mg d'enzyme) (l'activité DNasique correspond au tracé protéinique).

Tampon de départ : 250 ml de tampon phosphate 0,01 M pH = 8,4.
 Tampon limite : 125 ml de tampon phosphate 0,3 M pH = 4,3.

la DNase I cristallisée (en noir) obtenus lors de la chromatographie sur DEAE cellulose du mélange sérum humain + DNase I cristallisée, 400 μ g de DNase I ont été incorporés à 2 ml de sérum humain correspondant à 140 mg de protéines. La DNase I passe totalement dans la fraction éluee par du tampon phosphate de molarité comprise entre 0,10 et 0,15 et de pH variant de 5,5 à 5,0. Le rendement protéinique est de 71 %, le rendement enzymatique de 62 %. Le schéma situé au-dessous de ce dernier représente le tracé protéinique observé lors de la chromatographie dans les mêmes conditions que précédemment de la DNase I cristallisée. On observe son élution pour les mêmes molarité et pH du

tampon que lorsqu'elle est mélangée aux protéines du sérum humain. Le rendement protéinique est de 72 % et le rendement enzymatique de 55 %.

II. — DISCUSSION.

Nous présentons dans le tableau XV les valeurs des rendements obtenus lorsqu'on évalue l'activité DNasique des 2 pics chromatographiques du sérum de chat, soit par la méthode classique de KURNICK, soit par la méthode de diffusion en gélose.

N° Chromato	Activité DNasique mise en oeuvre(UK)	Rendement calculé par la "Kurnick classique"	Rendement calculé par la méthode en gélose
52	8,40	70 %	76 %
68	10,80	66 %	81 %
76	12,0	63 %	76,6 %
81	10,0	60 %	80 %

TABLEAU XV

Valeurs comparatives des rendements en activité DNasique après chromatographie du sérum de chat sur DEAE cellulose
Les mesures de l'activité DNasique ont été effectuées d'une part par la méthode de Kurnick classique, d'autre part par la méthode en gélose

Les deux séries de résultats qui portent seulement sur un nombre restreint de chromatographies sont tout à fait comparables.

Le recouvrement de l'activité DNasique est plus faible lorsqu'il est calculé par la méthode classique de KURNICK. Ce fait n'est guère surprenant car les conditions requises pour le dosage par cette méthode sont beaucoup plus rigoureuses. En effet, la détection et l'évaluation quantitative des DNases par diffusion ne sont pas perturbées par la présence d'ions minéraux doués de propriétés inhibitrices ou par des conditions physico-chimiques d'environnement défavorables à l'activité des enzymes. Cette méthode permet d'éviter les dialyses, opérations qui altèrent l'activité de l'enzyme.

Plusieurs faits ont été mis en valeur lors des études chromatographiques des sérums de chat, de rat et de souris.

1) On note la présence dans le sérum de chat de deux pics nettement distincts possédant chacun une activité DNasique. Ce seul critère biochimique ne nous permet pas de conclure en faveur d'une dualité éventuelle des DNases dans ce sérum. BECKING et coll. (7) avaient déjà

décrit une hétérogénéité de la DNase pancréatique. D'autres études biochimiques et enzymologiques doivent être poursuivies afin d'étayer cette hypothèse.

2) Variation de l'élution des pics DNasiques avec l'espèce animale.

a) Chez le chat, l'élution du premier pic précède immédiatement l'élution du second. L'élution des 2 pics est pratiquée par du tampon phosphate de molarité comprise entre 0,10 et 0,18 et de pH compris entre 5,0 et 5,5.

b) Chez le rat, le pic DNasique est élué à l'aide de tampon phosphate de molarité comprise entre 0,09 et 0,12 et de pH compris entre 5,5 et 6,0.

c) Chez la souris C₃H et chez la souris XLII la DNase est éluée à l'aide de tampon phosphate de molarité voisine de 0,15 et de pH compris entre 5,8 et 6,0.

d) La DNase I cristallisée est éluée, dans les mêmes conditions opératoires que celles qui viennent d'être évoquées précédemment, avec du tampon phosphate de molarité comprise entre 0,10 et 0,15 et de pH compris entre 5,0 et 5,5.

3) L'électrophorèse sur gel d'amidon des 2 pics séparés du sérum de chat ne permet pas de mettre en évidence des protéines de mobilité différente.

4) Les méthodes de précipitation fractionnée par le (NH₄)₂SO₄ à saturation ont été assez décevantes dans le cas de la purification de la DNase I du sérum de chat. Ce sont pourtant des méthodes analogues qui ont été utilisées pour extraire et purifier la DNase I à partir du pancréas (6) (40) (41). Les rendements obtenus ont été médiocres. Il est des plus vraisemblables que la DNase se soit dénaturée au cours de l'expérimentation, mais il faut envisager également la possibilité de la sélection d'un inhibiteur.

5) Les méthodes chromatographiques, principalement celles effectuées sur DEAE cellulose, nous ont permis de séparer des fractions protéiniques dont l'activité spécifique en DNase est 7 à 14 fois supérieure à l'activité spécifique initiale.

C. — Caractérisation enzymatique

Les conditions expérimentales pratiquées dans la méthode des « acido-solubles » décrite par KUNITZ correspondent aux conditions optimales requises pour le dosage de la DNase pancréatique cristallisée par cet auteur. Ces conditions ont été précisées dans la deuxième partie de ce mémoire. Or il est possible que les DNases sériques que nous venons d'étudier :

- d'une part requièrent des conditions différentes pour manifester une activité maximale ;
- d'autre part ont chacune un mode d'action différent sur le substrat.

Dans ce chapitre nous nous sommes proposé de comparer les réactions enzymatiques :

- 1) des DNases sériques appartenant aux diverses espèces animales ;
- 2) des deux pics DNasiques différents isolés par chromatographie du sérum de chat afin d'établir s'ils ont un mode d'action sur le substrat qui correspond à deux enzymes identiques ou différents.

Nous avons effectué un certain nombre de déterminations qui sont énoncées dans le tableau XVI.

Source de DNase I	Mesure de l'activité DNasique					Km
	en fonction du pH	en fonction de la concentration en ions Mg^{++} et KMn	après préchauf- fage à diverses températures	après préchauffage à température constante en fonction du temps	en fonction de la tempé- rature	
Sérum total de chat	+	+	+	+	+	
Fraction DNasique I du sérum de chat	+	+	+			+
Fraction DNasique II du sérum de chat	+	+	+			+
Sérum total de rat Wistar	+	+	+	+	+	
Sérum humain + DNase I cristallisée	+	+	+			
Sérum total de souris C ₃ H	+	+	+	+	+	
Sérum total de souris XLII	+	+	+	+	+	

TABLEAU XVI

*Déterminations effectuées (+) pour l'étude de l'activité DNasique
des différents sérums et fractions chromatographiques
Facteurs intervenant dans la mesure de l'activité DNasique
par la méthode des « acido-solubles » de KUNITZ*

Les essais effectués sur le sérum humain + DNase de KUNITZ ont été pratiqués dans les proportions suivantes de protéines et d'enzyme.

- protéines sériques = 18 μ g
- DNase de KUNITZ = 0,4 μ g

pour une prise d'essai de 0,25 ml habituellement utilisée lors du dosage du désoxyribose (Réaction de Burton) par la méthode des « acido-solubles ».

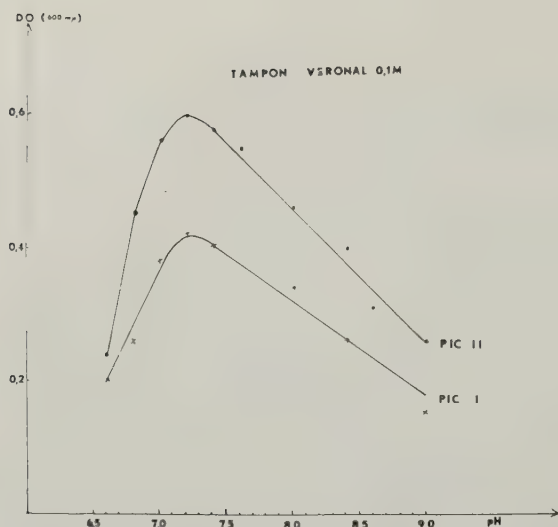


FIG. 12. — Courbes d'activité DNasique en fonction du pH (entre 6,6 et 9,0) dans du tampon véronal 0,1 M, des pics DNasiques I et II isolés par chromatographie sur DEAE-cellulose. Le pic I contient 15 mg de protéines et 20 μ g de DNase, le pic II 11 mg de protéines et 22 μ g de DNase

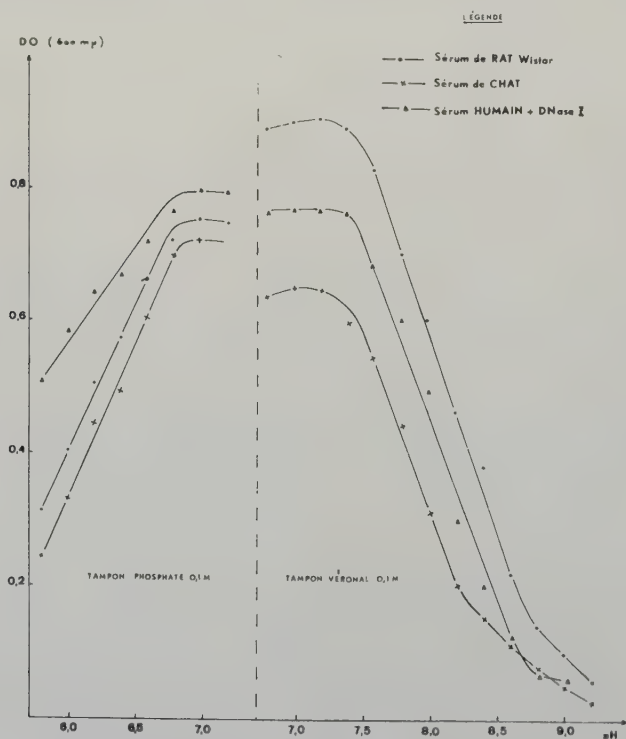


FIG. 13. — Courbes d'activité DNasique en fonction du pH des sérums de chat, de rat Wistar, et du sérum humain + DNase I cristallisée. On a utilisé un système de tampon phosphate 0,1 M pour explorer les pH compris entre 5,8 et 7,2 et du tampon véronal 0,1 M pour les pH compris entre 6,8 et 9,2

I. — RÉSULTATS.

1) Détermination de l'activité DNasique en fonction du pH.

Sur la figure 12 sont tracées les courbes d'activité DNasique I des pics I et II et du sérum total de chat. Dans les deux cas l'optimum d'activité est observé pour un pH de 7,2 en tampon véronal sodique 0,1 M.

La figure 13 rend compte des résultats obtenus avec le sérum pur de chat, de rat Wistar et le sérum humain + DNase I cristallisée. Dans tous les cas on observe un optimum d'activité pour les pH compris entre 6,8 et 7,2 aussi bien avec du tampon véronal 0,1 M que du tampon phosphate 0,1 M.

Les courbes de la figure 14 mettent en évidence une activité DNasique maximale des sérums de souris C₃H et XLII lorsque la réaction est pratiquée aux pH compris entre 6,8 et 7,4.

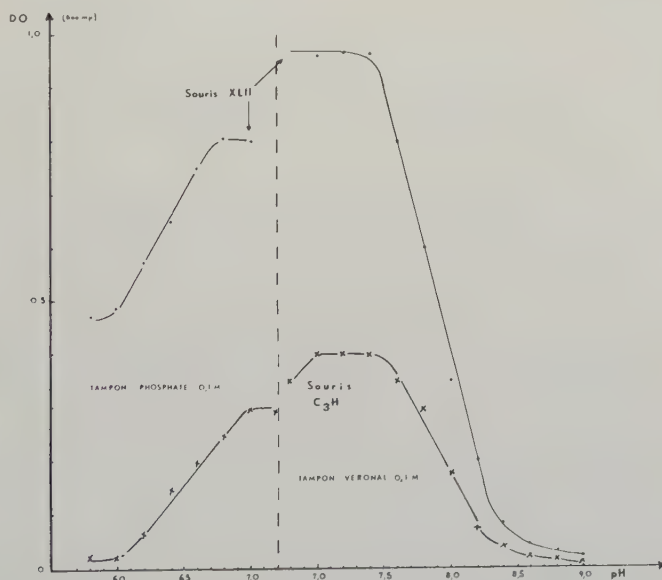


FIG. 14. — Courbes d'activité DNasique en fonction du pH des sérums de souris de souche C₃H et XLII

2) Détermination de l'activité DNasique en fonction de la concentration en ions Mg⁺⁺ et Mn⁺⁺.

Les courbes d'activité DNasique en fonction de la concentration en ions Mg⁺⁺ et Mn⁺⁺ sont tracées sur les figures 15, 16, 17.

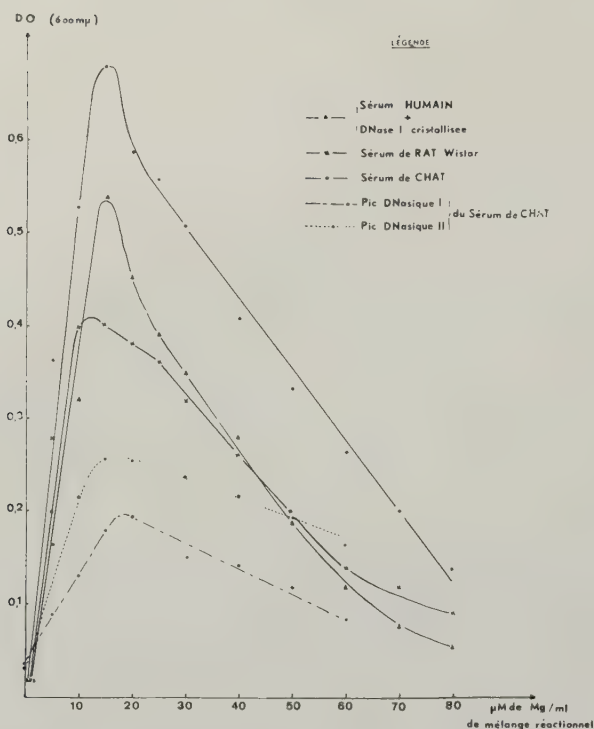


FIG. 15. — Courbes d'activité DNasique en fonction de la concentration en ions Mg^{++} d'une part des sérums de chat, rat Wistar et homme + DNase I, d'autre part des pics DNasiques I et II

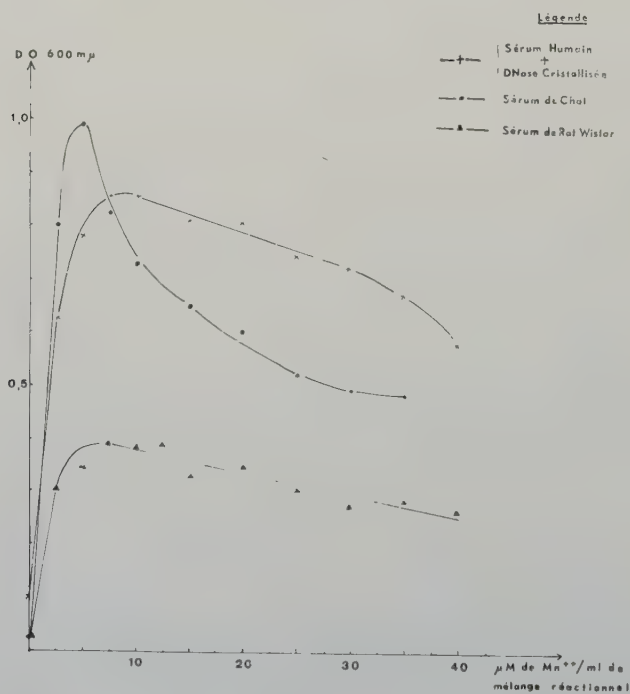


FIG. 16. — Courbes d'activité DNasique en fonction de la concentration en ions Mn^{++} des sérums de chat, rat Wistar et homme + DNase I

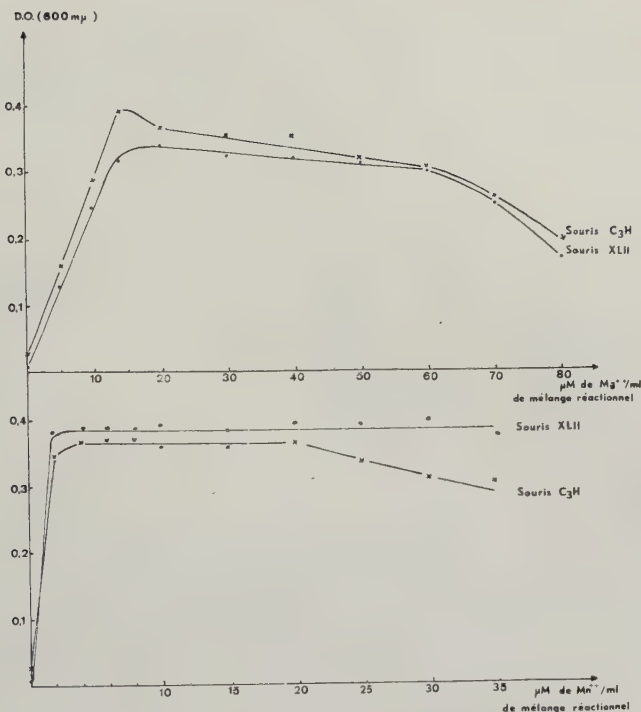


FIG. 17. — Courbes d'activité DNasique des sérums de souris de souche C_3H et XLII d'une part en fonction de la concentration en ions Mg^{++} , d'autre part en fonction de la concentration en ions Mn^{++} .

On observe une activité DNasique maximale pour les valeurs de $15 \mu M$ de Mg^{++} par millilitre de mélange réactionnel dans tous les types de sérum étudiés de même que dans les pics DNasiques I et II du sérum de chat.

Dans le cas du Mn^{++} l'activité maximale est obtenue pour une concentration de 2 à $3 \mu M/ml$ pour le sérum de souris, de $5 \mu M/ml$ pour le sérum de chat et de rat, et de $10 \mu M/ml$ pour le sérum humain + DNase I cristallisée.

3) Détermination de l'activité DNasique après préchauffage à diverses températures.

La figure 18 rend compte des résultats obtenus sur les pics DNasiques I et II isolés du sérum de chat. On peut observer une augmentation de l'activité DNasique après préchauffage des deux pics à $46^\circ C$.

La pente qui caractérise la dénaturation thermique de la DNase est beaucoup plus accentuée dans le cas du pic II. En effet à $50^\circ C$ on observe

encore une densité optique de 0,6 pour le pic I alors que pour le pic II on obtient une densité optique de 0,2. Il faut ajouter que, lors du préchauffage, les fractions correspondant aux 2 pics étaient dissoutes dans les mêmes volumes de NaCl 0,14 M, et que les différents points ont été déterminés en même temps pour les deux pics.

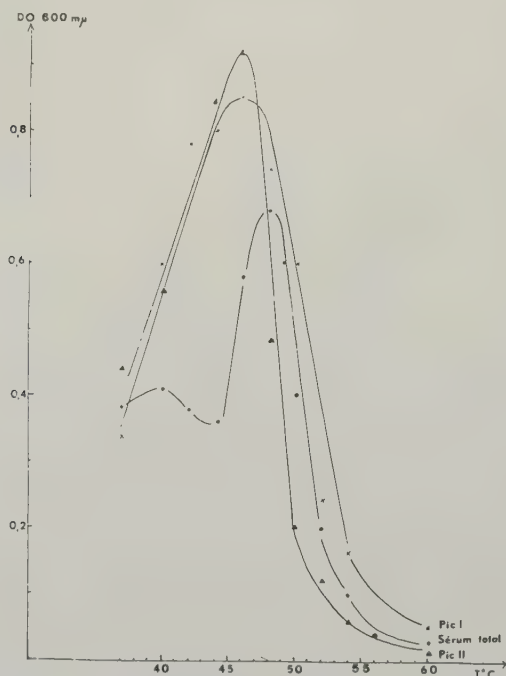


FIG. 18. — Courbes d'activité DNasique après préchauffage de 30 minutes à diverses températures du sérum de chat et des pics DNasique I et II. Le pic DNasique I contient 15 mg de protéines et 20 μ g de DNase, le pic DNasique II 11 mg de protéines et 22 μ g de DNase

La figure 19 rend compte des résultats obtenus sur du sérum total de chat, de rat Wistar, et sur du sérum humain + DNase I cristallisée. L'activité DNasique maximale est observée pour la température de 48 °C dans le sérum de chat et de 46 °C dans le sérum de rat Wistar. Dans le sérum humain + DNase I cristallisée on remarque la présence de deux optima pour les températures de 48 °C et 52 °C.

Il apparaît nettement sur la figure 20 que l'activité DNasique des sérums de souris C₃H et XLII est maximale lorsqu'ils subissent avant la mise en œuvre de la réaction un chauffage de 50 °C pendant 30 mn.

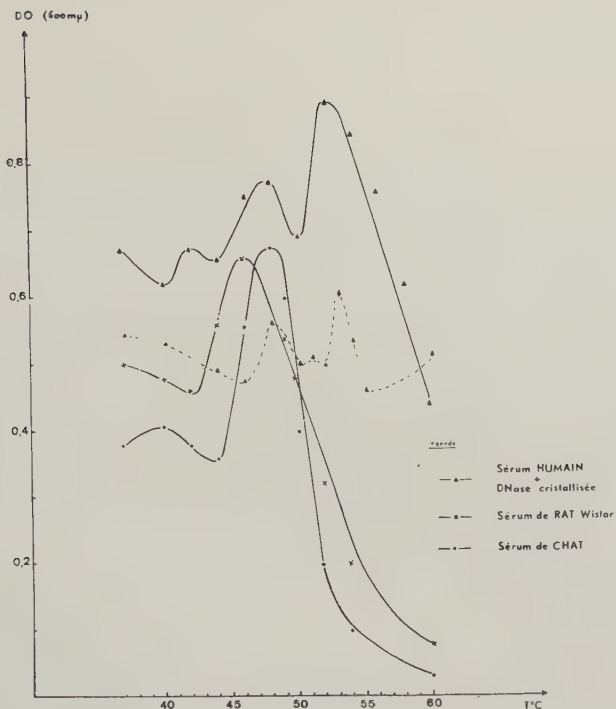


FIG. 19. — Courbes d'activité DNasique après préchauffage de 30 minutes à diverses températures des sérums de chat, rat Wistar et homme + DNase I. La courbe en pointillé représente l'activité DNasique du sérum humain + DNase I après préchauffage du sérum humain seul

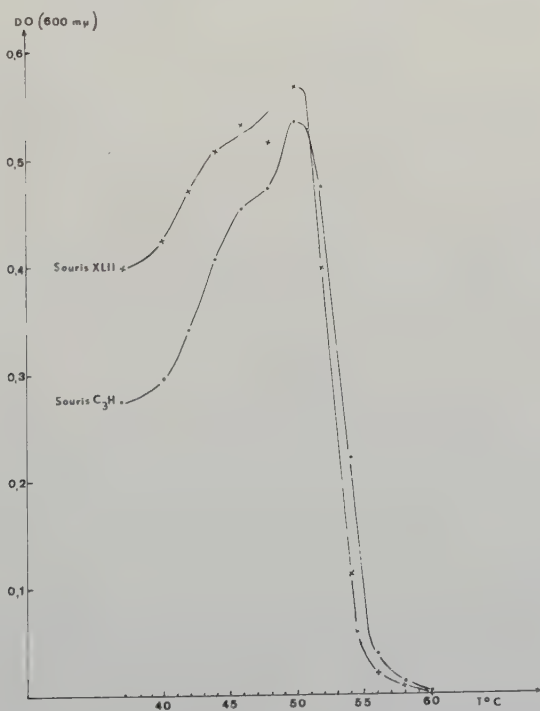


FIG. 20. — Courbes d'activité DNasique après préchauffage de 30 minutes à diverses températures des sérums de souris C₃H et XLII

4) *Etude de l'inactivation de la DNase à température constante en fonction du temps.*

La figure 21 présente les courbes d'inactivation de la DNase I des sérums de chat, rat Wistar, souris C₃H et XLII en fonction de la durée du préchauffage à la température de 52 °C. On remarque que :

— l'activité DNasique des sérums de chat et de rat Wistar décroît linéairement en fonction du temps pour devenir pratiquement nulle après un préchauffage de 6 h à 52 °C ;

— l'activité DNasique des sérums de souris C₃H et XLII décroît également linéairement en fonction du temps après un temps de latence qui est d'environ 3 h. L'activité DNasique devient pratiquement nulle après un préchauffage de 7 à 8 h à 52 °C.

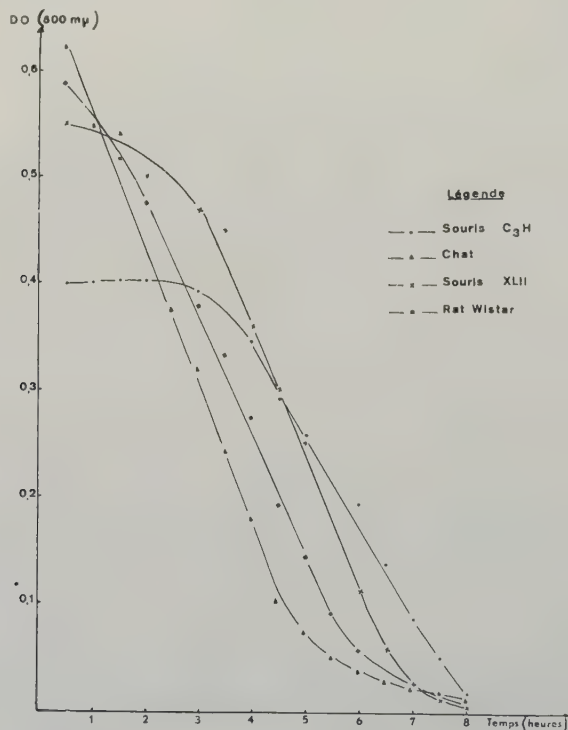


FIG. 21. — Inactivation de l'activité DNasique des sérums de chat, rat Wistar, souris C₃H et XLII, en fonction de la durée du préchauffage à 52 °C

5) *Détermination de l'activité DNasique en fonction de la température.*

Cette détermination de l'activité DNasique est faite en pratiquant l'incubation enzyme-substrat pendant 30 mn à diverses températures.

La figure 22 rend compte des résultats obtenus avec le sérum total de souris, de chat et de rat. Il en résulte que la dénaturation de la DNase du sérum de souris apparaît à la température de 56 °C tandis qu'elle commence aux environs de 52 °C et de 50 °C respectivement chez le chat et le rat.

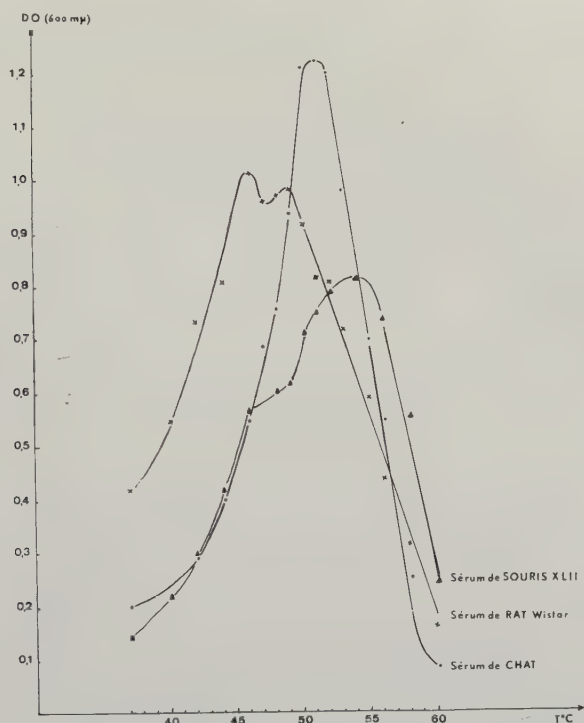


FIG. 22. — Courbes d'activité DNasique des sérums de chat, de rat Wistar et de souris XLII en fonction de la température de réaction enzymatique

6) Détermination de la Constante de MICHAELIS.

Pour des raisons de commodité dans l'élaboration des résultats on utilise la représentation graphique de LINEWEAVER et BURK (55).

Les résultats expérimentaux sont résumés dans les tableaux XVII et XVIII. Chaque tableau comporte les données expérimentales suivantes :

- la durée de la réaction en minutes ;
- la concentration du substrat S en mg/ml ;

Essai n°	TEMPS (minutes)	S (mg/ml)	$\frac{1}{S}$	v	$\frac{1}{v} \cdot 10^{-3}$
1	20	0,166	6,0	6,5	155
		0,333	3,0	10,5	95
		0,666	1,50	16,0	62
2	25	0,166	6,0	8,0	125
		0,333	3,0	12,5	78
		0,666	1,50	20,0	50
3	30	0,166	6,0	9,8	103
		0,333	3,0	15,0	65
		0,666	1,50	24,0	42
4	35	0,166	6,0	11,6	87
		0,333	3,0	18,0	55
		0,666	1,50	28,0	35

TABEAU XVII

Vitesse d'action enzymatique du pic I en fonction de la concentration en substrat, exprimée en μ moles de P/ADN libérées par ml et par minute dans le surnageant acido-soluble

Essai n°	TEMPS (minutes)	S (mg/ml)	$\frac{1}{S}$	v	$\frac{1}{v} \cdot 10^{-3}$
1	20	0,166	6,0	9	111
		0,333	3,0	15	65
		0,500	2,0	20	50
		0,666	1,50	25	40
2	25	0,166	6,0	11	87
		0,333	3,0	20	50
		0,500	2,0	25	40
		0,666	1,50	32	31
3	30	0,166	6,0	14	72
		0,333	3,0	22	45
		0,500	2,0	29	34
		0,666	1,50	38	26
4	35	0,166	6,0	16	62
		0,333	3,0	26	38
		0,500	2,0	34	28
		0,666	1,50	45	22

TABEAU XVIII

Vitesse d'action enzymatique du pic II en fonction de la concentration en substrat, exprimée en μ moles de P/ADN libérées par ml et par minute dans le surnageant acido-soluble

— la vitesse d'action enzymatique v , mesurée pour chaque concentration du substrat. Elle est exprimée en micromoles de P/ADN libérées par millilitre et par minute dans le surnageant « acido-soluble » ;

— l'inverse de la vitesse $\frac{1}{v} \cdot 10^{-2}$;

— l'inverse de la concentration en substrat $\frac{1}{S}$.

S

Ces résultats permettent de tracer un ensemble de droites qui convergent vers un même point M situé sur l'axe des abscisses.

L'abscisse du point M a pour valeur $-\frac{1}{K_m}$. D'après la représentation graphique des figures 23 et 24, on voit que $-\frac{1}{K_m}$ a pour valeur

K_m

— 1,25 mg/ml pour le pic DNasique I et — 1,20 mg/ml pour le pic DNasique II, ce qui correspond à des valeurs de K_m respectivement de 0,80 mg/ml et 0,83 mg/ml.

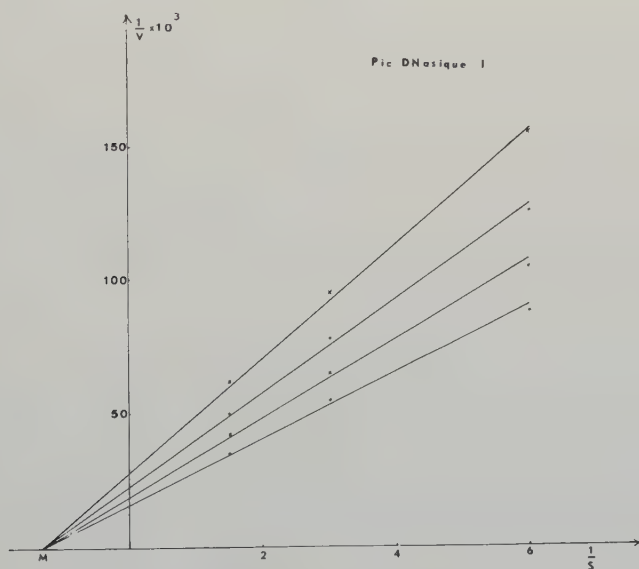


FIG. 23. — Détermination du K_m du pic DNasique I isolé du sérum de chat par chromatographie sur DEAE-cellulose

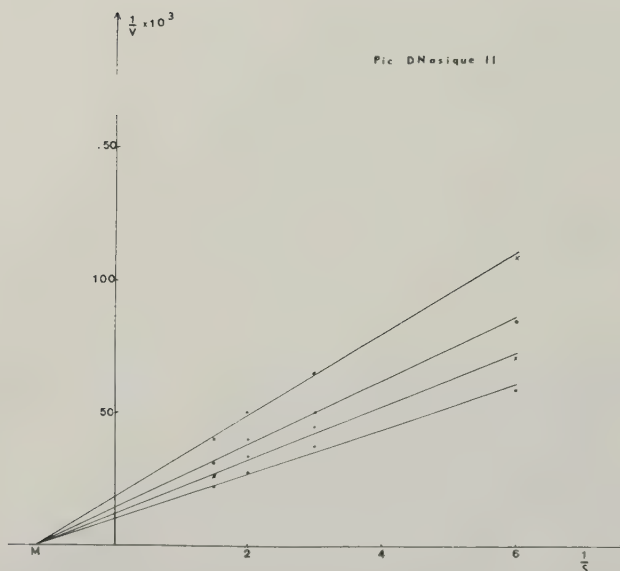


FIG 24. — Détermination du K_m du pic DNasique II isolé du sérum de chat par chromatographie sur DEAE-cellulose

II. — DISCUSSION.

A) Résultats relatifs aux pics DNasiques I et II¹ isolés du sérum de chat.

1) Les études de l'activité DNasique en fonction d'une part du pH, et d'autre part de la concentration en ions Mg^{++} , ne permettent pas de différencier les deux activités enzymatiques présentes dans le sérum de chat. En effet, dans les deux cas, les courbes d'activité sont pratiquement superposables. La plus forte activité du pic II peut être due au fait qu'il est moins contaminé par les protéines étrangères, son activité spécifique en DNase est supérieure à celle du pic I.

2) En ce qui concerne les courbes d'activité DNasique après préchauffage, deux faits ressortent de notre étude.

a) Si l'on se reporte à la figure 18 on voit qu'il se produit une activation de l'enzyme contenu dans les deux pics au fur et à mesure que la température s'élève. L'activation atteint une valeur maximale après chauffage des échantillons à une température voisine de 46 °C.

On peut expliquer ce fait par l'existence, dans chacun des deux pics, d'un inhibiteur thermolabile qui se détruirait entièrement à 46 °C.

1. Nous rappelons que le terme « pics DNasiques I et II » peut prêter à confusion. Il s'agit de DNase de type I séparée en deux pics DNasiques (I et II) par chromatographie sur cellulose dans le cas du sérum de chat

Il faut rappeler que, bien que le K_m des pics I et II soit assez voisin de celui de la DNase cristallisée, la présence d'un inhibiteur n'est pas à exclure. En effet les inhibiteurs enzymatiques peuvent agir d'une manière réversible ou irréversible. Dans le premier cas l'enzyme retrouve son activité après disparition de l'inhibiteur, ce qui prouve l'existence d'un équilibre entre l'inhibiteur libre et l'enzyme. Dans le second cas cet équilibre n'existe pas, l'inhibition est progressive et, si la quantité d'inhibiteur est suffisante, l'inhibition peut être totale.

Les inhibiteurs à action réversible agissent sur la cinétique de la réaction enzymatique en modifiant la valeur du K_m ou de la vitesse maximale V . L'inhibition est dite compétitive dans le cas où l'inhibiteur provoque une augmentation de la valeur du K_m , il y a compétition entre inhibiteur et substrat vis-à-vis de l'enzyme.

L'inhibition est dite non compétitive dans le cas où l'inhibition ne provoque aucune modification apparente de la constante K_m , mais une diminution de la vitesse maximale V .

Il est donc fort possible que l'on soit en présence de deux fractions DNasiques complexées avec un inhibiteur présent en plus ou moins grande quantité selon la fraction.

b) Au-dessus de 46 °C, température pour laquelle l'activité est maximale, on observe le début de la dénaturation thermique de la DNase. Cette dénaturation est très brutale. Lorsque la température augmente de 6 °C l'activité DNasique devient très faible.

Cependant il existe à cet égard une différence notable entre le pic I et le pic II. La DNase du pic II est plus sensible à l'action de la chaleur. A 48 °C son activité a baissé d'environ 50 %, alors qu'on observe une très faible chute d'activité de la DNase du pic I.

A 50 °C elle a diminué de 80 % alors que l'activité du pic I a baissé seulement de 30 %.

On peut envisager deux hypothèses pour tenter d'expliquer ce phénomène.

α) Les DNases du pic I et du pic II sont constitutionnellement différentes, l'une étant plus thermostable que l'autre.

β) L'existence dans le pic I d'un système protégeant la DNase de l'action de la chaleur. On peut supposer qu'un tel système soit absent dans la fraction du pic II. En effet il ne paraît pas invraisemblable que ce système soit élué en même temps que le pic I lors de la chromatographie sur DEAE cellulose. Si l'on se reporte toujours à la figure 18 sur laquelle nous avons tracé également la courbe d'activité DNasique du sérum total de chat après chauffage à diverses températures, on constate que l'activité DNasique est maximale après chauffage à 48 °C, et qu'elle a diminué d'environ 47 % à 50 °C.

Les chiffres qui sont reportés dans le tableau XIX représentent le pourcentage de la chute d'activité DNasique après chauffage à diverses températures du pic I, du pic II, et du sérum total. La moyenne arithmétique de la chute d'activité des pics I et II y est également incluse et comparée à celle du sérum total. Ces chiffres peuvent être comparables parce que :

- d'une part les deux pics possèdent des activités DNasiques voisines (correspondant à 20 μ g de DNase pour le pic I et à 22 μ g pour le pic II) ;
- d'autre part l'activité DNasique des pics I et II représente l'activité DNasique totale du sérum.

Température de préchauffage	Chute de l'activité DNasique (en %)			
	PIC I	PIC II	Sérum Total	Moyenne I + II
46° C	0	0	0	0
48° C	10 %	50 %	0	30 %
50° C	30 %	80 %	47 %	55 %

TABLEAU XIX

Diminution de l'activité DNasique par rapport à l'activité maximale obtenue après préchauffage à diverses températures
La moyenne arithmétique du pourcentage de la chute de l'activité DNasique des pics I et II a été établie

D'après les chiffres inscrits dans ce tableau on peut se rendre compte qu'après chauffage à 50 °C la chute d'activité DNasique dans le sérum total est d'environ 47 %. Si on fait la moyenne arithmétique de la chute d'activité observée dans les pics I et II on voit qu'elle atteint une valeur de 55 %. Les deux valeurs 47 % et 55 % sont relativement voisines. On pourrait alors penser que le complexe DNase-inhibiteur isolé lors de la chromatographie serait plus thermo-résistant dans le pic I que dans le pic II.

3) La constante de MICHAELIS peut être définie simplement comme la concentration en substrat pour laquelle dans les conditions expérimentales la vitesse de la réaction enzymatique est égale à la moitié de la vitesse maximale.

Le calcul de K_m résulte d'études théoriques développées par Henry puis Michaelis et Menten. La formule qui l'exprime est
$$v = \frac{V \cdot S}{I + K_m}$$

dans laquelle v est la vitesse initiale de la réaction, V la vitesse maximale et S la concentration du substrat.

Les valeurs de $\frac{1}{v}$ sont calculées en fonction de $\frac{1}{S}$, la courbe représentative est alors une droite dont la pente est $\frac{K_m}{S}$. Cette droite coupe l'axe des abscisses au point $\frac{1}{S} = -\frac{1}{K_m}$. Cette théorie suppose une

réaction monomoléculaire entre le substrat et l'enzyme. Mais dans le cas de l'ADN cette réaction n'est pas monomoléculaire, en effet la DNase coupe la molécule d'ADN en hydrolysant les fonctions diester et il est possible de concevoir qu'une seule molécule de DNase puisse réagir plusieurs fois avec la même molécule de substrat.

Pour tenter d'appliquer les théories classiques au système ADN-DNase, LE PECQ (51) a essayé de simplifier le problème en associant un site à chaque coupure possible et en identifiant la molécule de substrat des théories classiques au support moléculaire du site. Des travaux expérimentaux portant sur des études de cinétique de dégradation de complexes ADN-colorants (vert de méthyle et acridine) ont permis à LE PECQ de déterminer la taille de ce site qui est de 6 nucléotides dans le cas de l'ADN du thymus de veau et qui possède un poids moléculaire moyen de 2 100. Cette molécule de site ainsi définie peut être assimilée à la molécule de substrat des théories classiques monomoléculaires. La notion de « molécule de site » permet donc d'appliquer le calcul de K_m aux molécules d'ADN.

Le TALAER et LE PECQ (53) ont alors entrepris l'étude du K_m de la DNase pancréatique cristallisée par KUNITZ. Ils ont trouvé la valeur de 1 mg/ml. Lors de notre étude du K_m des deux pics DNasiques isolés du sérum de chat par chromatographie sur DEAE cellulose nous avons trouvé des valeurs très voisines (0,80 mg/ml pour le pic I et 0,83 mg/ml pour le pic II).

Les deux pics DNasiques ont le même K_m , extrêmement voisin de celui de la DNase pancréatique. Dans ces conditions, il est impossible de différencier ces deux pics d'activité DNasique par leur cinétique d'action enzymatique. Cependant, le fait que ces deux pics DNasiques aient le même K_m n'exclut pas la possibilité que l'on soit en présence de deux enzymes différents.

B) Discussion des résultats obtenus sur le sérum total.

1) Etude comparative des sérums de chat, rat et souris.

a) En ce qui concerne les pH nous avons obtenu des résultats semblables dans tous les cas. Nous observons une activité DNasique maximale pour des pH compris entre 6,8 et 7,2. Les variations du pH sont obtenues à l'aide soit d'un tampon phosphate 0,1 M soit d'un tampon

véronal 0,1 M ceci afin d'explorer plus aisément les zones de pH acide et alcalin. On peut remarquer que l'activité enzymatique du sérum humain + DNase I et du sérum de souris XLII est moins sensible aux pH acides que la DNase des sérums de chat, de rat, et de souris C₃H (figures 13 et 14).

b) En ce qui concerne l'influence de la concentration en ions Mg^{++} , on peut estimer que, dans tous les sérums étudiés, l'optimum se situe pour 15 $\mu M/ml$, la présence de Mg^{++} étant nécessaire à l'activité de l'enzyme. L'ion Mg^{++} peut être remplacé par un autre activateur, l'ion Mn^{++} qui semble même être plus actif et agir à des concentrations moindre, de 2 à 5 $\mu M/ml$ suivant les sérums. Un excès de Mn^{++} ne semble pas nuire à l'activité DNasique surtout en ce qui concerne les sérums de rat, souris, et homme + DNase, si l'on en juge par la faible décroissance d'activité au fur et à mesure que la concentration s'élève.

c) Les résultats relatifs à l'activité DNasique après préchauffage permettent de constater une activation très nette débutant pour un préchauffage à 42-43 °C du sérum de rat et de souris, et à 44-45 °C du sérum de chat. L'activation est maximale dans le sérum de rat à 46 °C, dans le sérum de chat à 48 °C, et dans le sérum de souris à 50 °C. Au-dessus de ces températures, la DNase se dénature assez rapidement. Dans le sérum les DNases du rat, du chat et de la souris sont stables, leurs propriétés enzymatiques se maintiennent pendant un temps relativement long. Des sérums de chat et de rat conservés à + 4 °C pendant 45 j ont gardé intacte leur activité DNasique.

L'activation enzymatique maximale obtenue après un préchauffage à 46 °C du sérum de rat, à 48 °C du sérum de chat, et à 50 °C du sérum de souris est produite d'une manière constante. L'hypothèse de la destruction d'un inhibiteur moins thermorésistant que la DNase pourrait être émise.

d) Pour compléter cette étude, nous avons voulu nous rendre compte du rôle joué par les protéines sériques vis-à-vis de la DNase, en étudiant le phénomène sur du sérum humain d'activité DNasique presque nulle auquel nous avons ajouté de la DNase I cristallisée. Pour ce faire il suffit dans un premier temps de préchauffer du sérum humain à diverses températures dans les conditions déjà décrites, dans un second temps d'ajouter une même quantité de DNase cristallisée et de mesurer l'activité DNasique résultante. Les résultats de cette expérience sont représentés sur la figure 19 par le tracé de la courbe en pointillé. On peut observer deux pics de réactivation de la DNase qui correspondent aux deux pics observés lors du préchauffage du sérum humain + DNase. Il faut de plus remarquer que l'activité DNasique après chauffage à 60 °C du sérum seul puis addition de l'enzyme est pratiquement équivalente à celle du chauffage à 37 °C. Ces résultats sont en faveur de la présence dans

le sérum d'au moins deux inhibiteurs de la DNase I qui sont détruits respectivement aux températures de 48-49 °C et 52-53 °C.

e) En ce qui concerne l'étude de l'inactivation de la DNase à 52 °C en fonction de la durée du préchauffage on peut constater (figure 21) que l'activité DNasique des divers sérums décroît linéairement en fonction du temps. La pente qui caractérise l'inactivation de la DNase est pratiquement identique dans les quatre types de sérum. On observe cependant chez la souris C₃H et XLII un temps de latence d'environ 3 h durant lesquelles la DNase n'est pas inactivée. On peut expliquer ce phénomène par le fait que la DNase de souris est plus thermostable que celle du chat et du rat.

f) Les courbes ayant trait à l'étude de l'activité DNasique en fonction de la température d'incubation enzyme-substrat sont tracées sur la figure 22. On observe une augmentation de l'activité enzymatique en fonction de la température, puis celle-ci décroît lorsqu'on atteint la température de dénaturation de la DNase. Ces résultats sont difficiles à interpréter car de nombreux facteurs peuvent influencer (18).

2) Etude comparative des sérums de souris C₃H et XLII.

Les résultats recueillis au cours des études biochimiques et enzymatiques nous permettent de conclure que les sérums de souris C₃H et de souris XLII possèdent des DNases I dont les propriétés physico-chimiques sont identiques.

CINQUIEME PARTIE

ETUDE GENETIQUE DE LA DESOXYRIBONUCLEASE I DU PLASMA DE LA SOURIS

Dans un travail précédent BOHUON (9) avait observé que l'activité DNasique du plasma de souris de souche C₃H était plus faible que celle de la souche XLII. A partir de cette observation, nous avons entrepris une étude plus complète et montré dans la troisième partie de ce mémoire que le taux de DNase plasmatique était significativement différent dans les souches C₃H et XLII. Par contre, aucune différence significative n'a été décelée entre les animaux mâles et femelles.

Par ailleurs il a été établi dans le chapitre précédent que :

1) Il existe probablement dans chacun de ces deux types de sérum un inhibiteur de DNase I moins thermo-stable que l'enzyme.

2) La DNase I des sérums de souris C₃H et de souris XLII possède des caractères biochimiques et enzymatiques identiques. A la suite de ces observations nous nous sommes proposé de compléter l'étude de la DNase de souris par une étude de son conditionnement génétique. Avant d'exposer nos résultats, nous rappellerons l'état de nos connaissances actuelles concernant l'existence des divers enzymes de mammifères supérieurs dont on a pu prouver la transmission héréditaire selon les lois génétiques bien établies.

Nous reproduisons sur le tableau XX la liste des principaux enzymes génétiquement déterminés de mammifères supérieurs.

Les exemples de mise en évidence du conditionnement génétique de la cholinestérase et de la β glucuronidase méritent d'être cités. La découverte du contrôle génétique de la cholinestérase est l'aboutissement d'un travail biochimique remarquable à partir d'une observation clinique. Il a été montré que l'activité cholinestérasique des sérums humains est diversement sensible à l'action des inhibiteurs de cholinestérase. KALOW et coll. (36) (37) ont défini le nombre de dibucaïne (DN) qui représente le pourcentage d'inhibition de l'activité cholinestérasique d'un sérum en présence de dibucaïne dans des conditions soigneusement contrôlées. Les sérums se divisent en trois groupes correspondant chacun à un DN donné. L'étude de la répartition de ces groupes dans

Nature de l'enzyme	Origine biologique	Substrat	Manifestation pathologique	Auteurs
Atropine-estérase	Sérum de lapin	Atropine	Inconnue	SAVIN et coll. (76)
Cholinestérase	Sérum humain	Succinyl-choline	Sensibilité au Succinéthonium	KALOW et coll. (56)(37)
Galactose-1-P Uridyl transférase	Sang humain	Uridine glucose-di-P	Galactosémie	KALCKAR et coll. (35)
Aryléstérase	Plasma de porc	Phényl acétate	Inconnue	AUGUSTINSON et coll. (3) (4) (5)
Glucose-6-P deshydrogénase	Hématies humaines	Glucose 6-P	Hypersensibilité à la primaquine ⁽⁺⁾	KIRKMAN et coll. (39)
Phosphatase acide	Hématies humaines	Phénolphtaléine phosphate	Inconnue	HOPKINSON et coll. (32)
β glucuronidase	Foie de souris	Phénolphtaléine glucuronide	Inconnue	LAW et coll. (50)
Phénylalanine hydroxylase	Foie humain	Phénylalanine	Oligophrénie Phényl pyruvique	MITOMA et coll. (59)
Acide homogentisique-oxydase	Foie humain	Acide homogentisique	Alcaptonurie	LA DU et coll. (47)

TABLEAU XX

*Quelques enzymes de mammifères supérieurs génétiquement conditionnés
Ces enzymes se manifestent phénotypiquement soit par une diminution
soit par une perte apparente de leur activité*

(+) Ces sensibilités à certains médicaments ne constituent pas vraiment des manifestations pathologiques.

différentes familles a montré que ces trois phénotypes sont déterminés par deux gènes alléliques ; les valeurs extrêmes correspondent aux homozygotes, les valeurs intermédiaires aux hétérozygotes. La fréquence du gène atypique ne semble pas varier dans les populations blanches de différentes origines et peut être estimée à 0,02 % c'est-à-dire que le phénotype homozygote atypique se trouve selon une probabilité de 1 sur 1 000 à 5 000 individus testés. Il est prouvé que les sérums atypiques doivent leur propriété non à une baisse de leur concentration en enzyme normal, mais à la substitution à cet enzyme, d'un enzyme anormal présent en concentration normale ; autrement dit, le défaut enzymatique est dû à une anomalie structurale des molécules protéiniques, anomalie découlant d'un vice de synthèse. Les deux espèces de molécules enzymatiques ont des propriétés chimiques et physico-chimiques très voisines ; il est impossible notamment de les séparer par les moyens conventionnels. Seule l'électrophorèse en gel d'amidon imprégné d'un inhibiteur de l'activité enzymatique tel que le décaméthonium permet la séparation ; cette méthode est d'utilisation délicate.

L'étude du contrôle génétique de la β glucuronidase hépatique représente le type même de l'étude que nous avons entreprise dans la détermination du contrôle génétique de la DNase de souris. LAW et coll. (50) sont partis d'observations antérieures qui mettaient en évidence dans

le foie des taux de β glucuronidase variables suivant la souche de souris. En effet MORROW et coll. (62) ont noté que la souche C_3H possédait le dixième du taux de β glucuronidase observé dans d'autres souches telles que la $C_{57}Bl$, CBA, etc. Après croisement entre la C_3H et une souche à forte concentration, LAW et coll. (50) ont obtenu des distributions du taux de β glucuronidase qui correspondaient à la ségrégation d'une simple paire de gènes agissant soit sous leur forme dominante soit sous leur forme récessive.

Ces deux exemples illustrent deux possibilités se traduisant phénotypiquement par un défaut d'enzyme. Dans le premier cas, il s'agit de la substitution d'un enzyme normal par un enzyme anormal présent en concentration normale. C'est « l'erreur innée du métabolisme » de GARROD (25). Dans le second cas, il s'agit d'une diminution de la concentration en enzyme normal.

Après ce rappel concernant le contrôle génétique des enzymes nous allons présenter les résultats que nous avons obtenus lors de l'étude génétique de la DNase I du plasma de souris.

I. — Résultats

Nous reproduisons sur la figure 25 un schéma représentant la répartition de l'activité DNasique dans le plasma des souris :

- 1) des lignées parentales C_3H et XLII ;
- 2) des hybrides de première génération F_1 provenant du croisement des femelles XLII avec des mâles C_3H ;
- 3) des hybrides de seconde génération F_2 provenant du croisement des femelles F_1 avec des mâles F_1 ;
- 4) de la lignée de retour à la femelle C_3H (back-cross n° 1) résultant du croisement des femelles C_3H avec des mâles F_1 ;
- 5) de la lignée de retour au mâle XLII (« back-cross » n° 2) résultant du croisement de femelles F_1 avec des mâles XLII.

Nous résumons dans les tableaux XXI, XXII, XXIII, XXIV et XXV les chiffres qui illustrent la figure 25.

II. — Discussion des résultats

La base de nos connaissances sur les lois génétiques qui régissent les différences innées observées dans le monde animal et végétal repose sur l'analyse des croisements expérimentaux. Peu de résultats concernant le conditionnement génétique des enzymes sont actuellement connus chez les mammifères supérieurs à l'exception toutefois de l'homme chez qui le développement récent d'une pathologie de l'hérédité a permis de démontrer la transmission héréditaire de nombreux enzymes.

		Total	Mâles	Femelles
Souche C_3H	Nombre de souris testées	100	50	50
	Valeur moyenne (UK/ml)	0,11	0,12	0,10
	σ_m	0,006	0,009	0,007
Souche XLII	Nombre de souris testées	80	40	40
	Valeur moyenne	0,29	0,29	0,29
	σ_m	0,01	0,01	0,01

TABLEAU XXI

Valeurs de l'activité DNasique en UK/ml des plasmas de souris C_3H et XLII
 σ_m représente l'écart-type de la moyenne

	Total	Mâles	Femelles
Nombre de souris	100	50	50
Valeur moyenne (UK/ml)	0,21	0,20	0,22
σ_m	0,006	0,007	0,008

TABLEAU XXII

Valeurs de l'activité DNasique en UK/ml
des plasmas de souris hybrides de première génération
provenant de croisements entre femelles XLII et mâles C_3H
 σ_m représente l'écart-type de la moyenne

	Total	Mâles	Femelles
Nombre de souris	50	25	25
Valeur moyenne (UK/ml)	0,23	0,25	0,24
σ_m	0,024	0,020	0,028

TABLEAU XXIII

Valeurs de l'activité DNasique en UK/ml
des plasmas de souris hybrides de seconde génération
issues de croisements entre femelles et mâles F_1
 σ_m représente l'écart-type de la moyenne

	Total	Mâles	Femelles
Nombre de souris	51	26	25
Valeur moyenne (UK/ml)	0,12	0,14	0,11
σ_m	0,009	0,012	0,013

TABLEAU XXIV

Valeurs de l'activité DNasique en UK/ml
des plasmas de souris issues de croisements de femelles C_3H et de mâles F_1
(« back-cross », n° 1)
 σ_m représente l'écart-type de la moyenne

	Total	Mâles	Femelles
Nombre de souris	51	25	26
Valeurs moyenne (UK/ml)	0,28	0,29	0,26
σ_m	0,019	0,029	0,023

TABLEAU XXV

*Valeurs de l'activité DNasique en UK/ml
de plasmas de souris issues de croisements entre mâles XLII et femelles F₁
(« back-cross », n° 2)
 σ_m représente l'écart-type de la moyenne*

Chez la souris, le seul travail expérimental reposant sur une étude purement génétique est celui déjà cité de LAW et coll. (50) qui ont démontré que la β glucuronidase hépatique dépendait d'un seul gène. Les autres travaux se rapportent à des variations souvent importantes d'une souche à l'autre du taux de divers enzymes (estérases butyriques mammaire (14) et sérique (38) (77) xanthine-oxydase (24) et catalase (27) hépatiques, facteurs antiprotéolytiques sériques (13)).

Les résultats de l'étude des croisements expérimentaux entre les souris de souche C₃H et XLII font apparaître nettement que la DNase I du plasma de souris est sous contrôle génétique. En effet en se reportant à la figure 25 et aux tableaux XXI et XXV on peut constater les principaux faits suivants.

1) Il existe des différences significatives entre les taux d'activité DNasique du plasma de souris isogénique C₃H et XLII.

2) Après croisement de la souris C₃H caractérisée par une faible concentration de DNase dans le plasma (valeur moyenne 0,11 UK/ml) avec la souris XLII à forte concentration (valeur moyenne 0,29 UK/ml) on obtient des hybrides F₁ dont la concentration correspond à la moyenne de ces deux valeurs extrêmes (0,21 UK/ml).

Les différences du taux d'activité DNasique sont génétiquement conditionnées.

3) Après croisement de retour aux C₃H la répartition de l'activité DNasique prédomine dans la zone des faibles activités correspondant à la lignée parentale C₃H.

4) Après croisement de retour aux XLII on obtient par contre une répartition de l'activité DNasique vers les fortes activités correspondant à la lignée parentale XLII.

5) Après croisement des hybrides F₁ entre eux on obtient une lignée F₂ dont le taux moyen de DNase plasmatique (0,23 UK/ml) est très voisin de celui observé chez les hybrides F₁ (0,21 UK/ml). La dispersion des valeurs individuelles est cependant plus grande, de plus on n'observe

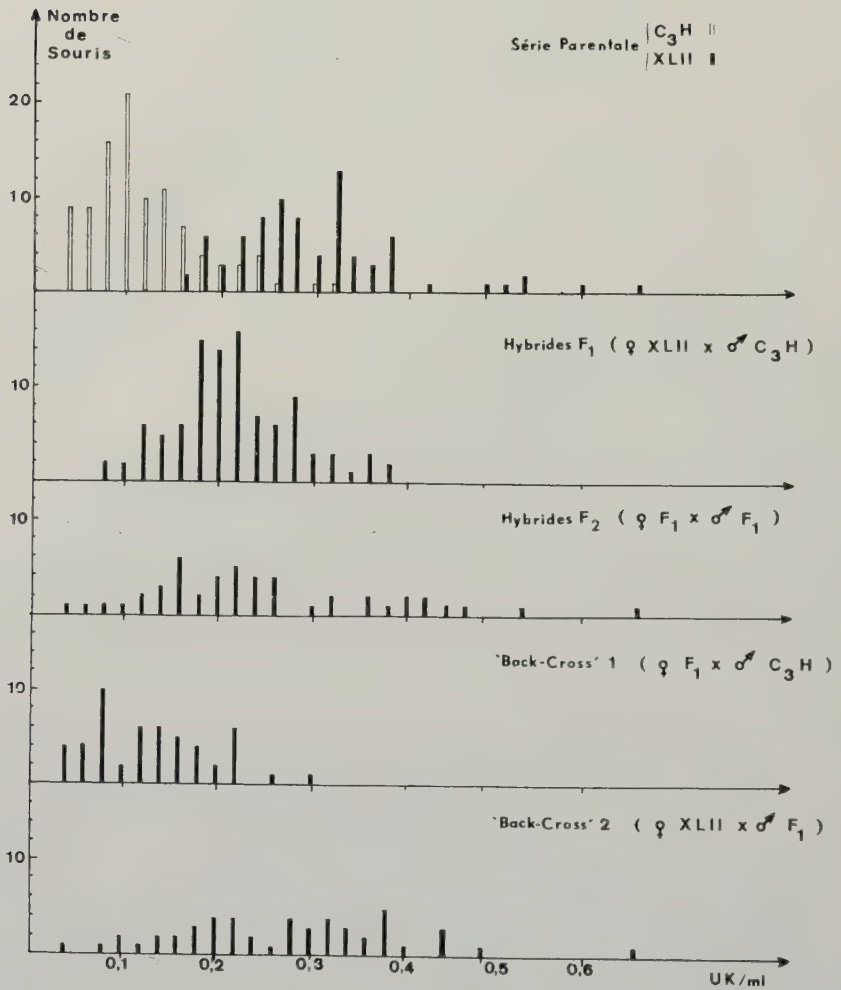


FIG. 25. — Etude de la répartition génétique de l'activité DNasique dans les plasmas de souris :

- de souche C_3H et XLII (série parentale) ;
- des hybrides de première génération (série F_1) ;
- des hybrides de seconde génération (série F_2) ;
- de la lignée de retour aux C_3H (« back-cross », n° 1) ;
- de la lignée de retour aux XLII (« back-cross », n° 2).

pas de ségrégation des valeurs, ce fait implique que le taux de DNase est sous la dépendance non pas d'un seul gène mais d'un système poly-génique.

6) L'hypothèse de la présence d'inhibiteurs (dans la souche C_3H) ou d'activateurs (dans la souche XLII) protéiniques génétiquement conditionnés, n'est pas confirmée par les déterminations d'activité DNasique effectuées sur des mélanges de plasmas (tableau XXVI).

Valeurs individuelles des plasmas		Valeurs des plasmas mélangés à parties égales.	
Souris C_3H (UK/ml)	Souris XLII (UK/ml)	Expérimentalement (UK/ml)	Théoriquement (UK/ml)
0,11	0,17	0,09	0,14
0,11	0,21	0,14	0,15
0,10	0,22	0,16	0,16
0,10	0,24	0,18	0,17
0,09	0,28	0,16	0,18
0,09	0,31	0,16	0,20
0,09	0,31	0,16	0,20
0,09	0,33	0,18	0,21

TABLEAU XXVI

*Activité DNasique du mélange à parties égales
des plasmas de souris C_3H et XLII*

CONCLUSIONS ET RÉSUMÉ

Dans ce travail nous étudions la désoxyribonucléase neutre (dite DNase I) du sérum sanguin de diverses espèces de mammifères supérieurs. Nos résultats portent d'une part sur les variations quantitatives du taux de cette activité et d'autre part sur l'étude biochimique et génétique des enzymes correspondants.

I. — *Variations quantitatives du taux d'activité DNasique I sérique.*

Le pouvoir hydrolysant des sérums de mammifères supérieurs vis-à-vis de l'ADN, à pH neutre (7,5) est très variable, il dépend :

a) de l'espèce animale.

Le sérum humain se caractérise par des taux extrêmement faibles de DNase I, de l'ordre de 5×10^{-3} unités Kurnick/ml, alors que le sérum de chat est particulièrement riche en cet enzyme, les concentrations étant supérieures à 2 unités Kurnick/ml, soit environ 200 fois plus fortes.

Chez le lapin et la souris les taux ont des valeurs intermédiaires situées entre 0,10 et 0,30 unité Kurnick/ml.

b) de la souche à l'intérieur d'une même espèce.

Nous avons constaté des différences significatives entre les deux souches de souris étudiées. La souche C₃H possède des taux plasmatiques faibles (moyenne 0,11 unité Kurnick/ml) par rapport à la souche XLII (moyenne 0,29 unité Kurnick/ml).

c) de la nature du sexe à l'intérieur d'une même souche.

Ces données concernent les rats de souche Wistar et de souche Sherman chez lesquels les animaux femelles possèdent des taux de DNase environ 4 fois supérieurs à ceux des mâles.

II. — *Etude biochimique de l'activité DNasique neutre sérique.*

1) Comparaison entre sérums de chat, de rat et de souris.

a) Mobilité à l'électrophorèse sur gel d'amidon.

La DNase rencontrée dans le sérum de chat est la plus mobile, celle

de la souris par contre est la moins mobile, tandis que la DNase du sérum de rat Wistar est douée de propriétés électrophorétiques intermédiaires.

b) Elution chromatographique sur di-ethyl-amino-ethyl (DEAE) cellulose.

Après absorption sur DEAE cellulose, les DNases sont éluées par des tampons phosphate dont la molarité et le pH varient suivant l'espèce animale. Ces valeurs sont résumées dans le tableau suivant.

	Molarité comprise entre	pH compris entre
CHAT	0,10 et 0,18 M	5,0 et 5,5
RAT WISTAR	0,09 et 0,12 M	5,5 et 6,0
SOURIS C ₃ H	0,15 M	5,8 et 6,0
SOURIS XLII	0,15 M	5,8 et 6,0

*Molarités du tampon phosphate éluant
la DNase contenue dans les sérums
de chat, de rat, et de souris*

c) Activité DNasique en fonction du préchauffage à diverses températures.

Le dosage de l'activité DNasique après préchauffage des sérums de chat, rat, et souris à diverses températures a permis de mettre en évidence un phénomène d'activation de l'enzyme. Ce phénomène se traduit par une augmentation de l'activité DNasique qui est maximale, pour une température donnée, et variable, suivant l'espèce animale. C'est ainsi que, chez le rat, on obtient une valeur maximale d'activité enzymatique après un préchauffage de 30 mn du sérum à 46 °C, tandis que, chez le chat et la souris, elle est obtenue respectivement aux températures de 48 °C et 50 °C.

Nous avons rassemblé au cours de cette étude, des faits expérimentaux difficiles à interpréter, et à partir desquels on peut cependant élaborer différentes hypothèses. Cette activation laisserait supposer, soit la présence dans ces sérums d'un inhibiteur de DNase plus thermosensible que l'enzyme, soit le fait que, sous l'influence de la chaleur, certaines protéines pourraient perdre des ions favorables à l'activation enzymatique. Nous nous proposons d'ailleurs de poursuivre ces travaux en essayant de dissocier le complexe enzyme-inhibiteur et d'isoler cet inhibiteur.

2) Désoxyribonucléase sérique du chat.

Lors de l'étude chromatographique sur DEAE et CM cellulose nous avons mis en évidence dans le sérum de chat deux pics DNasiques

nettement distincts. Les courbes de dénaturation thermique de leur activité DNasique sont différentes. Par contre, leurs courbes d'activité DNasique en fonction du pH, de la concentration en ions Mg^{++} de même que leur Km , sont identiques.

3) Désoxyribonucléase sérique de la souris : étude biochimique et génétique.

a) Etude biochimique.

Nous avons étudié comparativement un certain nombre de propriétés biochimiques et enzymatiques de la DNase I du sérum de souris C_3H et XLII.

D'après les critères électrophorétiques (gélose, gel d'amidon) chromatographiques (DEAE cellulose) et enzymatiques (activité DNasique en fonction du pH, en fonction de la concentration en ions Mg^{++} et en ions Mn^{++} , en fonction de la température de préchauffage des sérums), aucune différence n'est apparue entre ces DNases. On peut donc penser qu'il s'agit dans les deux cas de DNases identiques et que le conditionnement génétique démontré n'est pas dû à des différences de structure de la DNase d'une souche à l'autre.

b) Etude génétique.

Nous avons dosé la DNase de souris issues :

- des lignées parentales (C_3H et XLII) ;
- des hybrides de première génération ;
 - des hybrides de seconde génération ;
- de croisement de retour à la souche C_3H ;
- de croisement de retour à la souche XLII ;

nous pensons avoir montré que le taux d'activité DNasique était génétiquement conditionné.

BIBLIOGRAPHIE

1. ALLFREY V. G., MIRSKY A. E. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 43/689/1957.
2. AUBIN G., CHENAILLE P., LAMONTHEZIE N., PAOLETTI C. *Biochem. Biophys. Acta.* 72/456/1963.
3. AUGUSTINSSON K. B. *Ann. New York Acad. Sci.* 94/844/1961.
4. AUGUSTINSSON K. B., OLSSON B. *Biochem. J.* 71/484/1959.
5. AUGUSTINSSON K. B., OLSSON B. *Nature* 187/4741/1960.
6. BAUMGARTEN W., JOHNSON R. F., FINGER R. F., PAGENKEMPER F.F. *Arch. Biochem. Biophys.* 77/206/1958.
7. BECKING G. C., HURST R. O. *Canad. J. Biochem. Physiol.* 40/165/1962.
8. BERGER G., MAY P. C.R. *Acad. Sci.* 257/979/1963.
9. BOHUON C. Etudes des DNases chez les mammifères supérieurs et de leur variation sous l'influence de certaines agressions toxiques. Thèse Doctorat en Pharmacie, Paris, 1961.
10. BOMAN H. G. *Arkiv. Kemi.* 12/467/1958.
11. BURTON K. *Biochem. J.* 62/315/1956.
12. MAC CARTY M. J. *Gen. Physiol.* 29/123/1946.
13. CLIFTON E. E., ELLIOTT D. W., NERO W. J. *Cancer Res.* 9/422/1949.
14. COHEN S. L., BITTNER J. J. *Cancer Res.* 11/723/1951.
15. COOPER E. J., TRAUTMAN M. L., LASKOWSKI M. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 73/219/1950.
16. CUNNINGHAM L., LASKOWSKI M. *Biochem. Biophys. Acta.* 11/590/1953.
17. DABROWSKA W., COOPER E. J., LASKOWSKI M. *J. Biol. Chem.* 177/991/1949.
18. DIXON M., WEBB E. C., In *Enzymes*, Longmans, p. 150, 1958.
19. MACDONALD M. *Methods in Enzymology*, Acad. Press. New York, vol. III, p. 427, 1957.
20. DRYER R. C., TAMMES A. R., ROUTH J. J. *J. Biol. Chem.* 225/177/1957.
21. FALCONER D. S. *University Federation for Animal Welfare (UFAW Handbook)*. The care and management of laboratory animals. Londres, 1957.
22. FEINSTEIN R. N., GREEN F. O. *Arch. Biochem. Biophys.* 60/502/1956.
23. FESTY B., PAOLETTI C. C.R. *Acad. Sci.* 257/3682/1963.
24. FIGGE F. H. J., STRONG L. C. *Cancer Res.* 1/779/1941.
25. GARROD A. E. In *Inborn errors of metabolism* Oxford Univ. Press Londres, 1923.
26. GOSSE C., LE PECQ J. B., DEFRANCE P., PAOLETTI C. En préparation.
27. GREENSTEIN J. P. J. *Nat. Cancer Inst.* 2/345/1942.
28. GREGORY K. F. *Ann. New York Acad. Sci.* 94/657/1961.

29. HENSTELL H. H., FREEDMAN R. L., GINSBURG B. *Cancer Res.* 12/346/1952.
30. HERRIOT R. M., CONNOLY J. H., GUPTA S. *Nature.* 189/817/1961.
31. HEYMANN H., GULICK Z. R., MAYER R. L. *Nature.* 182/1234/1958.
32. HOPKINSON D. A., SPENCER N., HARRIS H. *Nature.* 199/969/1963.
33. JAYLE M. F. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 33/876/1951.
34. JOHNSON A. J., GOGER P. R., TILLET W. S. J. *Clin. Invest.* 33/1670/1954.
35. KALCKAR H. M., ANDERSON E. P., ISSELBACHER K. J. *Biochim. Biophys. Acta.* 20/262/1956.
36. KALOW W. In Ciba Foundation symposium on Biochemistry of human genetics J.A. Churchill Londres, p. 39, 1959.
37. KALOW W., GENEST K. *Canad. J. Biochem. Physiol.* 35/339/1957.
38. KHANOLKAR V. R., CHITRE R. C. *Cancer Res.* 2/567/1942.
39. KIRKMAN H. N., CROWELL B. B. *Nature.* 197/286/1963.
40. KUNITZ M. J. *Genet. Physiol.* 33/349/1950.
41. KUNITZ M. J. *Genet. Physiol.* 33/363/1950.
42. KURNICK N. B. *Arch. Biochem. Biophys.* 43/97/1953.
43. KURNICK N. B. In *Methods of Biochemical analysis*. Interscience Publishers vol. IX, p. 1, 1962.
44. KURNICK N. B., FOSTER M. W. J. *Genet. Physiol.* 34/147/1950.
45. KURNICK N. B., RADCLIFFE I. E. J. *Lab. Clin. Med.* 48/918/1956.
46. KURNICK N. B., SCHWARTZ L. I., PARISER S., LEE S. I. J. *Clin. Invest.* 32/193/1953.
47. LA DU B. N., ZANNONI V. G., LASTER L., SEEGMILLER J. E. J. *Biol. Chem.* 230/251/1958.
48. LASKOWSKI M. *Arch. Biochem.* 11/41/1946.
49. LASKOWSKI M. In *the Enzymes*. Acad. Press. New York, vol. V, p. 123, 1961.
50. LAW L. W., MORROW A. G., GREENSPAN E. M. J. *Nat. Cancer Inst.* 12/909/1952.
51. LE PECQ J. B., LE TALAER J. Y., FESTY B., TRUHAUT R. C.R. *Acad. Sci.* 254/3918/1962.
52. LE TALAER J. Y., FESTY B., TRUHAUT R. *Clin. Chim. Acta.* 8/925/1963.
53. LE TALAER J. Y., LE PECQ J. B., FESTY B., PAOLETTI C. R. *Acad. Sci.* 258/2698/1964.
54. LINDBERG U. *Acta Chem. Scand.* 17/898/1963.
55. LINEWEAVER H., BURK D. J. *Amer. Chem. Soc.* 56/658/1934.
56. LITTLE J. A., BUTLER G. C. J. *Biol. Chem.* 188/695/1951.
57. LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L., RANDALL R. J. J. *Biol. Chem.* 193/265/1951.
58. MAVER M. E., GRECO A. E. J. *Biol. Chem.* 181/861/1949.
59. MITOMA C., AULD R. M., UDENFRIEND S. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 94/634/1957.
60. MONZEN T. *Hiroshima J. Med. Sci.* 4/11/1955.
61. MORETTI J., BOUSSIER G., JAYLE M. F. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 39/593/1957.
62. MORROW A. G., GREENSPAN E. M., CARROLL D. M. J. *Nat. Cancer Inst.* 10/657/1949.
63. MOULE Y. *Arch. Sci. Physiol.* 7/161/1953.

64. PAOLETTI C., TRUHAUT R. dans Loiseleur — Techniques de Laboratoires — Ed. Masson, Paris, 1963.
 65. PAOLETTI C., GOSSE C., LE PECQ J. B. *Biokhymia*. 28/647/1963.
 66. PASCAUD X. Communication personnelle.
 67. PETERSON E. A., SOBER H. A. *J. Amer. Chem. Soc.* 78/751/1956.
 68. PETERSON E. A., SOBER H. A. *Analyt. Chem.* 31/857/1959.
 69. PETERSON E. A., SOBER H. A. In *Methods in Enzymology* Acad. Press, New York, vol. V, p. 3, 1962.
 70. POLSON G. *Biochem. Biophys. Acta*. 22/61/1957.
 71. POULIK M. D., SMITHIES O. *Biochem. J.* 68/636/1958.
 72. RALPH R. K., SMITH R. A., KHORANA H. G. *Biochemistry*. 1/131/1962.
 73. DE RECONDO A. M., FRAYSSINET C., MAY P. C.R. Acad. Sci. 255/2667/1962.
 74. RIOU G., PAOLETTI C., TRUHAUT R. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 44/149/1962.
 75. ROTH J. S. *Fed. Proc.* 11/277/1952.
 76. SAWIN P. B., GLICK D. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 29/55/1943.
 77. SHIMKIN M. B., GREENSTEIN J. F. *J. Nat. Cancer Inst.* 5/29/1944.
 78. SINSHEIMER R. L. *J. Biol. Chem.* 208/445/1954.
 79. SINSHEIMER R. L. *J. Biol. Chem.* 215/579/1955.
 80. SMITH C. L. *Arch. Biochem. Biophys.* 45/83/1953.
 81. SMITHIES O. *Biochem. J.* 61/629/1955.
 82. SMITHIES O. *Biochem. J.* 71/585/1959.
 83. SOBER H. A., GUTTER F. J., WYCKOFF M., PETERSON E. A. *J. Amer. Chem. Soc.* 78/756/1956.
 84. STANSLY P. G. *Biochem. Biophys. Acta*. 37/349/1960.
 85. TAMM C., SHAPIRO H. S., CHARGAFF E. *J. Biol. Chem.* 199/313/1952.
 86. TAKEMURA S. J. *Biochem.* 46/1285/1959.
 87. URIEL J. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 39/105/1957.
 88. WATSON J. D., CRICK F. H. C. *Nature*. 171/737/1953.
 89. WROBLEWSKI F., BODANSKY O. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 74/443/1950.
 90. ZAMENHOF S., ALEXANDER H. E., LEIDY G. J. *Exp. Med.* 98/373/1953.
-

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	VII
PREMIÈRE PARTIE.	
<i>Rappel bibliographique concernant les désoxyribonucléases I et leurs inhibiteurs</i>	I
I) Généralités sur les DNases I de mammifères supérieurs.....	1
II) Généralités sur les inhibiteurs de DNases I	5
DEUXIÈME PARTIE.	
<i>Méthodes générales utilisées</i>	9
A) Mesure de l'activité DNasique	9
I) Préparation de l'ADN	9
II) Dosage de la DNase I	11
1) Méthode de Kurnick.	
2) Méthode semi-quantitative en gélose.	
3) Méthode des « acido-solubles » de Kunitz.	
B) Fractionnement des protéines sériques	16
I) Techniques chromatographiques	16
II) Techniques électrophorétiques	19
1) Sur papier.	
2) Sur gélose.	
3) Sur gel d'amidon.	
4) Détection de l'activité DNasique :	
a) sur gélose,	
b) sur gel d'amidon.	
III) Technique de précipitation par le sulfate d'ammonium.....	22
C) Caractéristiques générales des animaux expérimentés.....	22
I) Origine génétique	22
1) Souris.	
2) Rats.	
3) Autres espèces animales.	
II) Caractéristiques générales : âge, poids, méthodes de prélèvement	23
III) Milieux biologiques utilisés	23
IV) Mise en œuvre de l'expérimentation génétique.....	24
TROISIÈME PARTIE.	
<i>Répartition des activités DNasiques chez quelques mammifères supérieurs</i>	27
I) Résultats.....	27
— Chez l'homme.	
— Chez le chat.	

- Chez le lapin.
- Chez le rat.
- Chez la souris.

II) Discussion	30
----------------------	----

QUATRIÈME PARTIE.

<i>Etudes biochimiques et enzymologiques de la DNase I du sérum de chat, de rat et de souris</i>	33
--	----

A) Différenciation électrophorétique des diverses DNases.....	34
---	----

I) Résultats.....	34
-------------------	----

- 1) Mobilité de la DNase en gélose.
- 2) Mobilité de la DNase à travers gel d'amidon.

II) Discussion	37
----------------------	----

B) Essais de purification	38
---------------------------------	----

I) Résultats.....	38
-------------------	----

- 1) Fractionnement chromatographique du sérum de chat.
- 2) Fractionnement chromatographique du sérum de rat Wistar.
- 3) Fractionnement chromatographique du sérum de souris C₃H et XI,II.
- 4) Fractionnement chromatographique de la DNase cristallisée de Kunitz.

II) Discussion	47
----------------------	----

C) Caractérisation enzymatique	48
--------------------------------------	----

I) Résultats.....	51
-------------------	----

- 1) Détermination de l'activité DNasique en fonction du pH.
- 2) Détermination de l'activité DNasique en fonction de la concentration en ions Mg⁺⁺ et Mn⁺⁺.
- 3) Détermination de l'activité DNasique après préchauffage à diverses températures.
- 4) Etude de l'inactivation de la DNase à température constante en fonction du temps.
- 5) Détermination de l'activité DNasique en fonction de la température.
- 6) Détermination de la constante de Michaelis.

II) Discussion	60
----------------------	----

A) Discussion des résultats obtenus sur les pics DNasiques I et II isolés du sérum de chat	60
--	----

B) Discussion des résultats obtenus sur le sérum total.....	63
---	----

- 1) Etude comparative des sérums de chat, rat et souris.
- 2) Etude comparative des sérums de souris C₃H et de souris XI,II.

CINQUIÈME PARTIE.

<i>Etude génétique de la désoxyribonucléase I du plasma de la souris....</i>	67
--	----

I) Résultats.....	69
-------------------	----

II) Discussion	69
----------------------	----

<i>Conclusions et résumé</i>	75
------------------------------------	----

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Renouvellement cellulaire chez les mammifères adultes.

Vu et approuvé :

Paris, le 22 février 1964

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

Marc ZAMANSKY.

Vu

et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean ROCHE.

Imprimé en France. — Imprimerie JOUVE, 15, rue Racine, PARIS (6^e). — 10-1964
N^o d'édition : 392. — Dépôt légal : 4^e trimestre 1964
